

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Resistência de espécies de *Mycobacterium* a diferentes condições de *stress* relacionadas com tratamentos de água

Ana Catarina Costa Martins

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada por:
Doutora Ana Reis
Doutor Ricardo Reis

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível graças ao apoio e incentivo de várias pessoas a quem não posso deixar de agradecer.

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador Doutor Ricardo Santos, pelo apoio, disponibilidade, conhecimento transmitido e encorajamento, indispensáveis à realização desta dissertação. Agradeço também à Doutora Ana Reis por todo o apoio e orientação disponibilizados sempre que necessário.

Quero agradecer igualmente à Doutora Sílvia Monteiro, pelos conselhos, ideias e resolução de algumas questões que surgiram ao longo do trabalho. Tenho também de reconhecer a ajuda imprescindível de todos os que partilharam este ano comigo no laboratório, em especial ao Miguel Oliveira, por todo o companheirismo, amizade e apoio ao longo deste trabalho.

Agradeço igualmente à coordenadora do Mestrado em Microbiologia Aplicada (FCUL), Doutora Lélia Chambel, pela ajuda e saber partilhado, fundamentais para o desenvolvimento desta dissertação.

Um agradecimento especial aos meus pais, António Martins e Maria Domingas Martins, e ao meu irmão, Pedro Martins, por todo o apoio incondicional, carinho, motivação e toda a paciência nas horas de desabafo e de ansiedade, sem os quais não teria sido possível concretizar este trabalho.

Por fim, quero agradecer à minha restante família e amigos por todos os conselhos, incentivos e apoio, fundamentais ao longo deste ano.

Obrigada a todos por tornarem esta dissertação possível!!



Resistência de espécies de *Mycobacterium* a diferentes condições de *stress* relacionadas com o tratamento de água

Ana Catarina Costa Martins

2018

O trabalho apresentado nesta dissertação de mestrado foi realizado no Laboratório de Análises do Instituto Superior Técnico sob a orientação direta do Doutor Ricardo Santos no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Resumo

O género *Mycobacterium* engloba mais de 150 espécies, incluindo saprófitos e patogénicos, das quais mais de 100 espécies são denominadas Micobactérias não-tuberculosas.

As Micobactérias não-tuberculosas estão altamente distribuídas numa grande variedade de reservatórios ambientais, muitos dos quais são partilhados com os Homens e animais, nomeadamente lagos, rios, solos, sistemas de distribuição de águas, entre outros.

Este projeto focou-se no estudo do comportamento destes microrganismos quando confrontados com condições ambientais adversas, particularmente algumas das condições a que são sujeitos durante os processos de desinfeção nos sistemas de distribuição de água. Para isso, testou-se a resistência de diferentes espécies de micobactérias não-tuberculosas, isoladas a partir de diferentes locais, a diferentes temperaturas, diferentes valores de pH, cloro e privação de nutrientes (alguns factores relacionados com os processos de desinfeção nos sistemas de tratamento de águas).

Observou-se que a maioria dos isolados em estudo têm uma grande amplitude de intervalos de crescimento quando comparados com outros microrganismos (nomeadamente extremófilos), crescendo entre intervalos de temperatura de 8-44 °C, de pH de 0-14 e de concentração de cloro de 1-10 ppm. Para além disso, estudou-se as respostas de algumas MNT em estudo quando em condições de privação de nutrientes (água destilada), ao longo de 4 meses, observando-se que as células entram num estado latente caracterizado pela não existência de alterações morfológicas, diminuição em 5x da concentração total de ATP (p/mL) e manutenção da concentração de células (UG/mL).

Estudou-se também a permeação de um isolado de micobactéria através de diferentes camadas do solo (areia e pedras), permitindo avaliar como se comportam estas bactérias quando se encontram no solo e aferir a possibilidade destas contaminarem os lençóis freáticos.

Os resultados obtidos demonstram a elevada resistência das micobactérias não-tuberculosas, em estudo, aos diferentes tipos de *stress* estudados, indicando que os isolados estudados apresentam estratégias de adaptação notáveis aquando do contacto com factores extremos. A capacidade das micobactérias em estudo se adaptarem a limites extremos de crescimento permite justificar, em parte, a manutenção e persistência destas espécies nos sistemas de distribuição de água. Isto indica que o estudo da resistência das micobactérias (não-tuberculosas) a diferente *stress* nas águas dos sistemas de distribuição é crucial para melhorar a eficácia dos processos de desinfeção utilizados nestes sistemas e consequentemente garantir a qualidade das águas de consumo.

Palavras-Chave: *Mycobacterium*; Micobactérias Não-Tuberculosas; Sistemas de distribuição de água; Resiliência; Comportamento.

Abstract

Mycobacterium encompasses more than 150 species, including pathogens and saprophytes, of which more than 100 species are termed non-tuberculous mycobacteria.

Mycobacteria are highly distributed in a wide variety of natural reservoirs, many of which are shared by both humans and animals, namely lakes, rivers, soils, water distribution systems, among others.

This project focused on the study of the behavior of these microorganisms when faced with adverse environmental conditions, particularly some of the conditions to which they are subjected during disinfection processes in water distribution systems. To achieve this, in this work, isolated species of nontuberculous mycobacteria from different areas, were tested for their resistance to temperature, pH, chlorine and nutrient starvation (factors related to the disinfection processes in water distribution systems).

It was observed that most of the studied species have high growth range when compared with other microorganisms (namely extremophiles), growing between temperature ranges of 8-44 °C, pH ranges of 0-14 and chlorine concentration of 1-10 ppm. In addition, the responses of some studied species under nutrient starvation conditions (growth in distilled water), over 4 months were studied, observing that the cells enter a latent state characterized by non-morphological changes, maintenance of the concentration of cells (UG/mL) and fivefold decrease of intracellular ATP level (p/mL).

It was also studied the permeation of a mycobacterial species through different layers of the soil (sand and stones), allowing to evaluate how these bacteria behave when they are in the soil and to verify the possibility of these contaminating the groundwater.

The obtained results demonstrate a high resistance of the isolated species to the different studied stress parameters, indicating that the isolated species presented remarkable adaptation strategies when they are exposed to extreme factors. The ability of the studied mycobacteria to adapt to extreme limits of growth justifies, in part, the maintenance and persistence of these species in water distribution systems. This indicates that the study of the resistance of mycobacteria (non-tuberculous) to different stresses in the water of the distribution systems is crucial to improve the efficiency of the disinfection processes used in these systems and consequently to guarantee the quality of drinking water.

Key-Words: *Mycobacterium*; Nontuberculous mycobacteria; Drinking water distribution systems; Resiliency; Behaviour.

Índice

Agradecimentos.....	II
Resumo.....	IV
Abstract	V
Lista Tabelas	VIII
Lista de Figuras	IX
Lista de Abreviaturas.....	XII
1. Introdução.....	1
1.1. Perspetiva Histórica.....	1
1.2. Género <i>Mycobacterium</i>	2
1.3. Epidemiologia	3
1.4. Sistemas de distribuição de água e a presença de microrganismos	4
1.5. Parede Celular	7
1.6. Biofilmes	9
2. Objetivos	10
3. Materiais e Métodos	10
3.1. Crescimento dos isolados de MNT em estudo	10
3.2. Extração DNA	10
3.3. Identificação dos isolados de MNT em estudo.....	10
3.4. Ensaio de crescimento de isolados a diferentes temperaturas	13
3.4.1. Inoculação de isolados de MNT	13
3.4.2. Quantificação da concentração total de proteínas (µg/mL) das células bacterianas	13
3.5. Ensaio de crescimento de isolados a diferentes pHs	14
3.5.1. Inoculação de isolados de MNT	14
3.5.2. Quantificação da concentração total de proteínas (µg/mL) das células bacterianas	14
3.6. Ensaio de crescimento a diferentes concentrações de Cloro	15
3.7. Ensaio de crescimento em condições de privação de nutrientes	15
3.7.1. Produção de ATP.....	15
3.7.2. Microscopia de Fluorescência Auramina-Rodamina	16

3.7.3.	Ensaio PCR Tempo Real.....	16
3.8.	Permeação através de superfícies	16
4.	Tratamento de Resultados	17
4.1.	Ensaio de crescimento de isolados a diferentes temperaturas	17
4.1.1.	Inoculação de isolados de MNT	17
4.1.2.	Quantificação da concentração total de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) das células bacterianas	20
4.2.	Ensaio de crescimento de isolados a diferentes pHs	25
4.2.1.	Inoculação de isolados de MNT	25
4.2.2.	Quantificação da concentração total de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) de células bacterianas	28
4.3.	Crescimento a diferentes concentrações de cloro.....	34
4.4.	Crescimento em condições de privação de nutrientes	37
4.4.1.	Forma das células – Microscopia	37
4.4.2.	Produção de ATP.....	42
4.4.3.	Monitorização da concentração total de bactérias (UG/mL).....	42
4.5.	Migração através de diferentes tipos de solos	45
5.	Discussão.....	47
6.	Conclusão	48
7.	Referências bibliográficas	49

Lista Tabelas

Tabela 3.1 – Origem, características físico-químicas e identificação das espécies de <i>Mycobacterium</i> utilizadas neste trabalho experimental.....	12
Tabela 4.1 - Crescimento dos 21 isolados selecionados, em MB, ao fim de 20 dias de incubação às diferentes temperaturas em estudo: 8 °C, 20 °C, 37 °C, 44 °C e 60 °C. Foi usado como controlo o crescimento, em MB, a 37 °C, durante o período de estudo. Representação: Crescimento: + (cor vermelha); Ausência de crescimento: – (cor preta); Contaminação do isolado: *.....	18
Tabela 4.2 - Crescimento dos 21 isolados selecionados, em H ₂ O, ao fim de 20 dias de incubação às diferentes temperaturas em estudo: 8 °C, 20 °C, 37 °C, 44 °C e 60 °C. Foi usado como controlo o crescimento em H ₂ O a 37 °C, durante o período de estudo. Representação: Crescimento: + (cor vermelha); Ausência de crescimento: – (cor preta); Contaminação do isolado: *.....	19
Tabela 4.3 – Crescimento dos isolados NPS 017, M.F. 22723, DSMZ 44848, SMG, 207B NPS 203 e NPS 129, em MB e H ₂ O, com 5 min de exposição às diferentes soluções com diferentes pHs em estudo (HCl: pH 0-5; H ₂ SO ₄ : pH 0-5 e NaOH: pH 7-14). Foi usado como controlo o crescimento em MB e H ₂ O com pH aproximadamente de 6 (sem adição de ácido ou base). Representação: Crescimento: + (cor vermelha); Ausência de crescimento: – (cor preta).....	26
Tabela 4.4 - Crescimento dos isolados NPS 017, M.F. 22723, DSMZ 44848, SMG, 207B NPS 203 e NPS 129, em MB e H ₂ O, com 1020 min de exposição às diferentes soluções com diferentes pHs em estudo (HCl: pH 0-5; H ₂ SO ₄ : pH 0-5 e NaOH: pH 7-14). Foi usado como controlo o crescimento em MB e H ₂ O com pH aproximadamente de 6 (sem adição de ácido ou base). Representação: Crescimento: + (cor vermelha); Ausência de crescimento: – (cor preta).	27
Tabela 4.5 - Crescimento dos isolados NPS 017, SMG, 207B, M.F.22723 e DSMZ 44848, em MB, com diferentes tempos de exposição – 10 min, 30 min, 2 h e 3 h- a diferentes concentrações de cloro – 1,2,5,7 e 10 ppm-, durante 30 dias. Foi usado como controlo o crescimento em MB dos isolados na ausência de adição de cloro (0 ppm de cloro). Representação: Crescimento: + (cor vermelha); Ausência de crescimento: – (cor preta).	34
Tabela 4.6 - Crescimento dos isolados NPS 017, SMG, 207B, M.F.22723 e DSMZ 44848, em H ₂ O, com diferentes tempos de exposição – 10 min, 30 min, 2 h e 3 h- a diferentes concentrações de cloro – 1,2,5,7 e 10 ppm-, durante 30 dias. Foi usado como controlo o crescimento em H ₂ O dos isolados na ausência de adição de cloro. Representação: + (cor vermelha) e Ausência de crescimento: – (cor preta).	35

Lista de Figuras

- Figura 1.1** - Representação do processo de tratamento das águas para consumo: 1) Triagem - A água entra no sistema de tratamento e atravessa uma série de painéis, desenhados para remover alguns resíduos presentes na água, como galhos e folhas; 2) Pré-Sedimentação – Nesta etapa, ocorre a deposição de uma elevada quantidade de areia e de sedimento presentes na água, enquanto esta flui lentamente dentro do reservatório; 3) Coagulação/ Floculação - Adicionam-se substâncias coagulantes, como sulfato de alumínio, à água enquanto esta flui para bacias de sedimentação. Estas substâncias apresentam carga positiva e desta forma neutralizam as impurezas e outras partículas em suspensão de carga negativa, formando partículas de maiores dimensões, designadas de flocos. Posteriormente, ocorre a indução das partículas destabilizadas de forma a que se agreguem em grandes aglomerados (flocos), que podem ser facilmente separados através de decantação, sendo este processo designado por floculação; 4) Sedimentação - Durante este processo, a água flui em bacias sedimentares e os flocos depositam-se no fundo do reservatório. Depois de aproximadamente 4 h, cerca de 85% do material suspenso está depositado; 5) Filtração - Neste processo, a água existente no topo das bacias flui através de filtros de gravidade, atravessando camadas de pequenos fragmentos de carvão duro, areia e cascalho. Os filtros permitem remover as pequenas partículas em suspensão da água; 7) Desinfecção – Nesta etapa, adiciona-se composto com cloro às águas para matar as bactérias e os vírus presentes na água. Em alguns casos adiciona-se amónia e cloro, que se combinam e formam compostos de cloramina. Estes compostos de cloramina podem ser usadas como desinfetantes secundários e são considerados mais estáveis e persistentes em comparação com a adição de cloro sozinho; 8) Adição de aditivos – No passo final do tratamento adicionam-se aditivos à água, de forma a melhorar a sua qualidade. Alguns dos aditivos adicionados são hidróxido de cálcio para reduzir a corrosão das tubagens e dos equipamentos dos sistemas de distribuição de água. É também adicionado carbono ativado para controlar o odor e o sabor das águas (Hickey, 2008) (Adaptado). 5
- Figura 1.2** - Estrutura da parede celular das micobactérias (Adaptado) (Brown *et al.*, 2015). 8
- Figura 4.1** - Concentração total de proteínas ($\mu\text{g/mL}$), dos isolados NPS 003, NPS 006, NPS 007, NPS 013, NPS 115, NPS 129, NPS 213, NPS 287, 101B, 207B, DSMZ 44848, SMG, NPS 203 e NPS 017, crescidas em MB, em relação ao controlo (crescimento a 37 °C), ao fim de 10 e 20 dias de incubação a 8 °C. (*) – Contaminação do isolado. 20
- Figura 4.2** - Concentração total de proteínas ($\mu\text{g/mL}$), dos isolados NPS 003, NPS 006, NPS 007, NPS 013, NPS 115, NPS 129, NPS 213, NPS 287, 101B, 207B, DSMZ 44848, SMG, NPS 203, NPS 017, crescidas em MB, em relação ao controlo (crescimento a 37 °C), ao fim de 10 e 20 dias de incubação a 20 °C. (*) – Contaminação do isolado. 20
- Figura 4.3** - Concentração total de proteínas ($\mu\text{g/mL}$), dos isolados NPS 003, NPS 006, NPS 007, NPS 013, NPS 115, NPS 129, NPS 213, NPS 287, 101B, 207B, DSMZ 44848, SMG, NPS 203 e NPS 017, crescidas em MB, em relação ao controlo (crescimento a 37 °C), ao fim de 10 e 20 dias de incubação a 44 °C. (*) – Contaminação do isolado. 21
- Figura 4.4** - Concentração total de proteínas ($\mu\text{g/mL}$), dos isolados NPS 003, NPS 006, NPS 007, NPS 013, NPS 115, NPS 129, NPS 213, NPS 287, 101B, 207B, DSMZ 44848, SMG, NPS 087, NPS 203 e NPS 017, crescidas em MB, em relação ao controlo (crescimento a 37 °C), ao fim de 10 e 20 dias de incubação a 60 °C. (*) – Contaminação do isolado. 21
- Figura 4.5** - Concentração total de proteínas ($\mu\text{g/mL}$), dos isolados NPS 003, NPS 006, NPS 007, NPS 013, NPS 115, NPS 129, NPS 213, NPS 287, 101B, 207B, DSMZ 44848, SMG, NPS 203 e NPS 017, crescidas em H₂O, em relação ao controlo (crescimento a 37 °C), ao fim de 10 e 20 dias de incubação a 8 °C. (*) – Contaminação do isolado. 22
- Figura 4.6** - Concentração total de proteínas ($\mu\text{g/mL}$), dos isolados NPS 003, NPS 006, NPS 007, NPS 013, NPS 115, NPS 129, NPS 213, NPS 287, 101B, 207B, DSMZ 44848, SMG, NPS 203 e NPS 017,

crescidas em H ₂ O, em relação ao controlo (crescimento a 37 °C), ao fim de 10 e 20 dias de incubação a 20 °C. (*) – Contaminação do isolado.....	22
Figura 4.7 - Concentração total de proteínas (µg/mL), dos isolados NPS 003, NPS 006, NPS 007, NPS 013, NPS 115, NPS 129, NPS 213, NPS 287, 101B, 207B, DSMZ 44848, SMG, NPS 203 e NPS 017, crescidas em H ₂ O, em relação ao controlo (crescimento a 37 °C), ao fim de 10 e 20 dias de incubação a 44 °C. (*) – Contaminação do isolado.....	23
Figura 4.8 - Concentração total de proteínas (µg/mL), dos isolados NPS 003, NPS 006, NPS 007, NPS 013, NPS 115, NPS 129, NPS 213, NPS 287, 101B, 207B, DSMZ 44848, SMG, NPS 203 e NPS 017, crescidas em H ₂ O, em relação ao controlo (crescimento a 37 °C), ao fim de 10 e 20 dias de incubação a 60 °C. (*) – Contaminação do isolado.....	23
Figura 4.9 - Concentrações totais de proteínas (µg/mL) de NPS 017, crescidas em MB ou H ₂ O, em relação ao controlo (crescimento a pH 6), ao fim de 1020 min de exposição ao stress com: A) Ácido Clorídrico (HCl); B) Ácido Sulfúrico (H ₂ SO ₄) e C) Hidróxido de Sódio (NaOH).	28
Figura 4.10 - Concentrações totais de proteínas (µg/mL) de M.F. 22723, crescidas em MB ou H ₂ O, em relação ao controlo (crescimento a pH 6), ao fim de 1020 min de exposição ao stress com: A) Ácido Clorídrico (HCl); B) Ácido Sulfúrico (H ₂ SO ₄) e C) Hidróxido de Sódio (NaOH). (*) – Contaminação do isolado.	29
Figura 4.11 - Concentrações totais de proteínas (µg/mL) de DSMZ 44848, crescidas em MB ou H ₂ O, em relação ao controlo (crescimento a pH 6), ao fim de 1020 min de exposição ao stress com: A) Ácido Clorídrico (HCl); B) Ácido Sulfúrico (H ₂ SO ₄) e C) Hidróxido de Sódio (NaOH). (*) – Contaminação do isolado	29
Figura 4.12 - Razão das concentrações totais de proteínas (µg/mL) de SMG, crescidas em MB ou H ₂ O, em relação ao controlo (crescimento a pH 6) (µg/mL) (%), ao fim de 1020 min de exposição ao stress com: A) Ácido Clorídrico (HCl); B) Ácido Sulfúrico (H ₂ SO ₄) e C) Hidróxido de Sódio (NaOH). (*) – Contaminação do isolado.	30
Figura 4.13 - Razão das concentrações totais de proteínas (µg/mL) de 207B, crescidas em MB ou H ₂ O, em relação ao controlo (crescimento a pH 6) (µg/mL) (%), ao fim de 1020 min de exposição ao stress com: A) Ácido Clorídrico (HCl); B) Ácido Sulfúrico (H ₂ SO ₄) e C) Hidróxido de Sódio (NaOH). (*) – Contaminação do isolado.	30
Figura 4.14 – Razão das concentrações totais de proteínas (µg/mL) de NPS 203, crescidas em MB ou H ₂ O, em relação ao controlo (crescimento a pH 6) (µg/mL) (%), ao fim de 1020 min de exposição ao stress com: A) Ácido Clorídrico (HCl); B) Ácido Sulfúrico (H ₂ SO ₄) e C) Hidróxido de Sódio (NaOH).	31
Figura 4.15 - Razão das concentrações totais de proteínas (µg/mL) de NPS 129, crescidas em MB ou H ₂ O, em relação ao controlo (crescimento a pH 6) (µg/mL) (%), ao fim de 1020 min de exposição ao stress com: A) Ácido Clorídrico (HCl); B) Ácido Sulfúrico (H ₂ SO ₄) e C) Hidróxido de Sódio (NaOH). (*) – Contaminação do isolado.....	31
Figura 4.16 - Representação microscópica do isolado DSMZ 448948 após a suspensão em água destilada (0 dias de privação de nutrientes). As células de <i>Mycobacterium</i> são álcool-ácido resistentes por isso apresentam-se como bacilos amarelo-laranja, em fundo predro (após coloração Auraminda-Rodamina). A imagem foi obtida com amplificação total de 400x.....	38
Figura 4.17 - Representação microscópica do isolado DSMZ 448948 após 4 meses de crescimento em água destilada (4 meses de privação de nutrientes). As células de <i>Mycobacterium</i> são álcool-ácido resistentes por isso apresentam-se como bacilos amarelo-laranja, em fundo predro (após coloração Auraminda-Rodamina). A imagem foi obtida com amplificação total de 400x.....	38
Figura 4.18 - Representação microscópica do isolado NPS 017 após a suspensão em água destilada (0 dias de privação de nutrientes).As células de <i>Mycobacterium</i> são álcool-ácido resistentes por isso	

apresentam-se como bacilos amarelo-laranja, em fundo predro (após coloração Auraminda-Rodamina). A imagem foi obtida com amplificação total de 400x.	39
Figura 4.19 - Representação microscópica do isolado NPS 017 após 4 meses de crescimento em água destilada (4 meses de privação de nutrientes).As células de <i>Mycobacterium</i> são álcool-ácido resistentes por isso apresentam-se como bacilos amarelo-laranja, em fundo predro (após coloração Auraminda-Rodamina). A imagem foi obtida com amplificação total de 400x.....	39
Figura 4.20 - Representação microscópica do isolado M.F. 22723 após a suspensão em água destilada (0 dias de privação de nutrientes).As células de <i>Mycobacterium</i> são álcool-ácido resistentes por isso apresentam-se como bacilos amarelo-laranja, em fundo predro (após coloração Auraminda-Rodamina). A imagem foi obtida com recurso à objetiva 40x.....	40
Figura 4.21 - Representação microscópica do isolado M.F. 22723 após 4 meses de crescimento em água destilada (4 meses de privação de nutrientes).As células de <i>Mycobacterium</i> são álcool-ácido resistentes por isso apresentam-se como bacilos amarelo-laranja, em fundo predro (após coloração Auraminda-Rodamina). A imagem foi obtida com recurso à objetiva 40x.....	40
Figura 4.22 - Monitorização da concentração total de ATP (em p/mL) dos isolados NPS 203, NPS 129, 207B, SMG, DSMZ 44848, M.F. 22723 e NPS 017 ao longo de 30 dias em condições de privação de nutrientes (crescimento em água destilada).....	42
Figura 4.23 - Monitorização da concentração total de células (UG/mL) dos isolados: A - NPS 017; B – M.F. 22723; C – DSMZ 44848; D – SMG; E- 207B; F – NPS 203; G - NPS 129 ao longo de 4 meses, em condições de privação de nutrientes (crescimento em água destilada).....	44
Figura 4.24 - Monitorização da concentração de SMG (UG/mL) recolhida no fim de uma coluna de pedras e de uma coluna de areia, a cada mm de água adicionada, aquando da adição de 20 mm de água.	45
Figura 4.25 - Monitorização da concentração de SMG (UG/mL) recolhida no fim de uma coluna de pedras e de uma coluna de areia, a cada mm de água adicionada, aquando da adição de 3 mm de água.	46

Lista de Abreviaturas

MNT – Micobactérias Não-Tuberculosas

pH – Potencial hidrogeniônico

XX – Vinte

SIDA – Síndrome de ImunoDeficiência Adquirida

µm – Micrometro

Gram + - Gram positivas

Gram - - Gram negativas

MAIS – *Mycobacterium avium*- *Mycobacterium intracellulare* – *Mycobacterium scrofulaceum*

MAC – Complexo *Mycobacterium avium*

I – Um

II – Dois

III – Três

IV – Quatro

mL – Mililitro

% - Percentagem

UV – UltraVioleta

EUA – Estados Unidos da América

β – Beta

α – Alfa

GPL - Glicopeptidolipidos

MB - *Middlebrook 7H9 Broth*

°C – Graus Centígrados

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*

µL – Microlitros

min – Minutos

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

rRNA – *Ribosomal ribonucleic acid*

s – Segundos

H₂O – Água

DO – Densidade óptica

nm – Nanómetro

µg – micrograma

BSA - *Bovine Serum Albumin*

Cu²⁺ - Ião Cobre (II)

Cu⁺ - Ião Cobre (I)

HCl – Ácido clorídrico

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

NaOH – Hidróxido de sódio

M – Molar

NaClO – Hipoclorito de Sódio

ppm – Partes por milhão

ATP – *Adenosine triphosphate*

p - Picomoles

r.l.u – Unidades de luz relativa

rpm – Rotações por minuto

UG – Unidades genómicas

m² – metro quadrado

mm – milímetro

L – Litro

(+) – Positivo

(-) – Negativo

H⁺ – Protão

HSO₄⁻ – Sulfato de hidrogénio

pKa – Constante de dissociação ácida

h – Horas

Log₁₀ – Logaritmo de base 10

1. Introdução

As Micobactérias Não-Tuberculosas (MNT) são um grupo de bactérias saprofíticas, disseminadas no ambiente, entre as quais existem alguns patogénicos humanos e animais (Falkinham III, 2002; Thomson *et al.*, 2013).

Estas bactérias habitam uma grande variedade de reservatórios ambientais, muitos dos quais são partilhados com os Homens e animais, nomeadamente lagos, rios, solos, sistemas de canalização, águas de consumo, entre outros (Falkinham III, 1996; Bercovier & Vincent, 2001; Santos *et al.*, 2015). A partilha destes habitats com humanos e animais é, possivelmente, um determinante na aquisição da doença (Falkinham III, 2009).

A presença e prevalência destas bactérias nestes ambientes pode ser explicada pela sua elevada resistência inata ao cloro e aos biocidas (Le Dantec *et al.*, 2002) e pela sua capacidade de formação de biofilmes (Schulze-Robbeke & Buchholtz, 1992; Schwartz *et al.*, 1998; Falkinham III, Norton & Mark, 2001).

Para além disso, as MNT apresentam uma elevada capacidade de sobrevivência em condições de privação de nutrientes, conseguindo, assim, sobreviver em águas com reduzida concentração de nutrientes (Nyka, 1974; Smeulders *et al.*, 1999).

A capacidade de as micobactérias resistirem aos desinfetantes comuns bem como a sua tolerância a elevadas gamas de pH e temperatura permite-lhes persistir nos sistemas de água de consumo (Carson *et al.*, 1978; du Moulin *et al.*, 1988; Schulze-Robbeke & Buchholtz, 1992; Falkinham Iii, 1996). Apesar do crescente interesse e preocupação das referidas resistências, os mecanismos envolvidos na sobrevivência das MNT nos sistemas de água ainda não são bem compreendidos (Le Dantec *et al.*, 2002).

Apenas recentemente, as micobactérias ambientais são reconhecidas como patogénicas emergentes, observando-se um aumento global do número de infeções causadas por estas micobactérias, nomeadamente pneumonia, infeções no espaço pleural, linfadenites, infeções nos tecidos leves e pele, meningite, infeções gastrointestinais, infeção disseminada, entre outras (Gentry, 1996).

Desta forma, é de máxima importância o estudo destas bactérias, de forma a compreender a sua ecologia, especialmente as suas interações com outros microrganismos e para detetar possíveis reservatórios ambientais e rotas de transmissão (Szewzyk *et al.*, 2000).

1.1. Perspetiva Histórica

Apesar de, segundo a paleomicrobiologia, o agente para a tuberculose ter sido detetado em esqueletos de animais e de humanos há cerca de 150 milhões de anos (Vivek, Thomas & Musser, 1994), o agente causador da tuberculose só foi isolado pela primeira vez em 1882, por *Robert Koch* e nomeado um ano depois como *Mycobacterium tuberculosis* (Cambau & Drancourt, 2014).

Poucos anos depois, as micobactérias não-tuberculosas foram distinguidas das micobactérias tuberculosas. Até metade do século XX, as MNT não eram consideradas patogénicos com importância clínica significativa, sendo este paradigma apenas alterado com a emergência das infeções pulmonares em pacientes com doenças pulmonares pré-existentes e posteriormente com a epidemia de Síndrome de Imuno Deficiência Adquirida (SIDA), que aumentou drasticamente a ocorrência de determinadas infeções oportunistas (Gentry, 1996).

1.2. Género *Mycobacterium*

O género *Mycobacterium* é um dos géneros definidos mais antigos, englobando mais de 150 espécies reconhecidas, incluindo patogéneos e saprófitos (Integrated Taxonomic Information System on-line database, 2017). Na ordem dos *Actinomycetales*, as micobactérias pertencem ao género *Mycobacterium*, que é o único género dentro da família *Mycobacteriaceae* (Stackebrandt, Rayney & Ward-rainey, 1997).

A primeira espécie de *Mycobacterium* isolada foi *Mycobacterium leprae* em 1875 por Hansen (Hansen, 1875). Mais tarde em 1882, Robert Koch isolou pela primeira vez o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* e provou que este era o agente etiológico da tuberculose. Contudo, só em 1896 é que o género *Mycobacterium* foi introduzido, por Lehmann e Neumann, após terem descoberto que *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium bovis* são os agentes causadores da tuberculose em pássaros e gado (Kazda *et al.*, 2009).

No início do século XX, as características usadas para definir as micobactérias eram a ausência de motilidade, morfologia do bacilo e a resistência característica a ácido-álcool seguida de coloração Ziehl-Neelsen (Rastogi, Legrande & Sola, 2001). Esta resistência ácido-álcool deve-se a diferentes componentes da parede celular das micobactérias, incluindo os lípidos presentes na camada externa, os ácidos micólicos ligados a arabinogalactano, bem como lipoglicanos (Vilchèze & Kremer, 2017).

Atualmente, as micobactérias são definidas como actinomicetes ácido-álcool resistentes, aeróbios e com forma ligeiramente curva ou em forma de bastonete (0.2-0.6 por 1.0-10 µm), com ocasional ramificação (Rastogi, Legrande & Sola, 2001; Kenneth & Ray, 2004). Estas bactérias Gram-positivas (Gram +) são organismos não-móveis, que não formam esporos e que apresentam na sua parede celular arabinose, galactose e ácido meso-diaminopimélico (Rastogi, Legrand & Sola, 2001; Plorde, 2004)

As micobactérias diferem das outras bactérias, Gram positivas e Gram negativas (Gram + e Gram –, respetivamente) devido à presença de uma camada fina de peptidoglicano rodeada por uma espessa membrana externa rica em lípidos (Brennan & Nikaido, 1995; Daffé & Draper, 1997).

As espécies do género *Mycobacterium* podem ser divididas em três grupos de acordo com a sua patogenicidade: patogéneos obrigatórios, potencialmente patogénicos e saprófitos ambientais (Rastogi, Legrand & Sola, 2001).

O primeiro grupo, é constituído pelos patogéneos obrigatórios (estritos), quer patogéneos humanos quer patogéneos animais, consistindo no complexo *Mycobacterium tuberculosis* – *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium pinnipedii* e *Mycobacterium tuberculosis* –, *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium lepraemurium*, que normalmente não são encontrados no meio ambiente (Portaels, 1995; Rastogi, Legrand & Sola, 2001). Estas micobactérias são espécies altamente especializadas que causam doença em humanos e animais. São normalmente altamente virulentas mesmo depois de uma reemergência da forma dormente após um longo período no hospedeiro infetado. Para garantir a sua sobrevivência no ambiente estas espécies necessitam de hospedeiros específicos que não desenvolvem a doença (Kazda, 2009).

O segundo grupo compreende as micobactérias potencialmente patogénicas (ou oportunistas) para humanos e animais, nomeadamente *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium simiae* e *Mycobacterium xenopi*. A maioria dessas espécies causa doença em humanos e animais, como por exemplo, lesões de pele, disfunções pulmonares e imunes e doenças crónicas. As espécies que pertencem a este grupo, para além de colonizar hospedeiros humanos e animais, conseguem também existir e multiplicar-se no meio ambiente (a sua principal fonte de contaminação). Antigamente, dentro deste grupo de patogéneos, o

termo *Complexo Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare-Mycobacterium scrofulaceum* (MAIS) foi usado para denotar um grupo de micobactérias de crescimento lento fenotipicamente semelhantes, muitas vezes difíceis de diferenciar. Atualmente, o termo MAIS foi substituído pelo termo MAC (*Complexo Mycobacterium avium*) desde que *Mycobacterium scrofulaceum* passou a ser relativamente fácil de diferenciar de *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare*. O MAC engloba as espécies *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare* (Portaels, 1995; Rastogi, Legrand & Sola, 2001; Kazda *et al.*, 2009).

O terceiro grupo consiste em micobactérias saprofíticas, que raramente causam doença. Neste grupo estão incluídas várias espécies como *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium phlei* (Rastogi, Legrand & Sola, 2001).

O segundo e terceiro grupo são muitas vezes designados por “Micobactérias atípicas”, “Micobactérias anónimas”, “Micobactérias ambientais patogénicas”, “Micobactérias ambientais potencialmente patogénicas” ou “Micobactérias não-tuberculosas”. As MNT constituem a maioria das espécies do género *Mycobacterium*, tendo sido descritas mais de 100 espécies (Gentry, 1996; Vaerewijck *et al.*, 2005).

As espécies de MNT foram classificadas em diferentes grupos por Runyon (1959), sendo esta classificação baseada na sua taxa de crescimento, morfologia celular e pigmentação (Sistema de Classificação de Runyon), obtendo-se assim quatro grupos. Os grupos I, II e III incluem apenas as micobactérias de crescimento lento, ou seja, as que necessitam de mais de uma semana (7 dias) para crescer (tempo semelhante ao requerido pela *Mycobacterium tuberculosis* para crescer em cultura) enquanto que as do grupo IV incluem as micobactérias de rápido crescimento, isto é, requerem em média menos de 7 dias (Runyon, 1959).

O grupo I inclui as espécies fotocromogéneas, isto é, micobactérias que produzem pigmentos amarelos-laranjas apenas na presença de luz (exemplos de espécies medicamente importantes são *Mycobacterium kansasii* e *Mycobacterium marinum*) (Runyon, 1959).

O grupo II é composto pelas espécies escotocromogéneas, isto é, produzem pigmentos amarelos-laranjas independentemente da presença ou ausência de luz. Este grupo inclui as espécies *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium gordonae* e *Mycobacterium szulgae*, entre outras.

O Grupo III compreende as espécies não-cromogéneas, ou seja, não produzem pigmentos independentemente das condições de crescimento. Este grupo inclui *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare* (que formam o complexo MAC), *Mycobacterium ulcerans* e outras espécies.

Por fim, no grupo IV estão incluídas as micobactérias de rápido crescimento incluindo *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* e *Mycobacterium abscessus* (Runyon, 1959).

1.3. Epidemiologia

As doenças causadas por MNT representam um problema de saúde pública global (Nishiuchi, Iwamoto & Maruyama, 2017), observando-se um aumento, a nível mundial, do número de infeções causadas por estas bactérias, principalmente por *Mycobacterium avium* (Portaels, 1995; Falkinham III, 2003).

O cenário das doenças causadas por MNT sofreu alterações notáveis com a emergência da epidemia da SIDA, começando assim, nos anos 70, a surgir o reconhecimento da importância clínica destas bactérias (Zakowski *et al.*, 1982; Falkinham III, 1996).

As doenças causadas por MNT apresentam uma maior prevalência em doentes imunocomprometidos (Piersimoni & Scarparo, 2009; Wolinsky, 1979). Historicamente, a maioria dos casos destas doenças ocorreram em homens com idade superior aos 40 anos e com fatores predisponentes, como doença pulmonar obstrutiva crónica e pneumoconiose (Kennedy & Weber, 1994; Wolinsky, 1979; Reich & Johnson, 1991).

O impacto das MNT na mortalidade e morbilidade dos pacientes com SIDA potenciou o início do estudo da epidemiologia, ecologia, genética, biologia molecular, taxonomia e fisiologia destas bactérias (Falkinham III, 1996). Para além disto, observou-se também um crescente estudo e desenvolvimento de métodos rápidos de isolamento e identificação (Havir, Kemper & Deresinski, 1993; Tortoli, 2003), testes de suscetibilidade de antibióticos (Inderlied, Young & Yamada, 1987) e de terapias antimicrobianas para estas bactérias (Woods *et al.*, 1999).

1.4. Sistemas de distribuição de água e a presença de microrganismos

Atualmente, há uma crescente preocupação e necessidade em garantir a elevada qualidade das águas de consumo, observando-se assim um avanço e um melhoramento dos métodos de tratamento utilizados, acompanhado da criação de legislação mais rigorosa em relação à qualidade das águas. As fontes de água de consumo são sujeitas a diversas contaminações, devido, nomeadamente, à erosão dos solos, à degradação da vegetação e às descargas de lixo industrial e doméstico. Assim, é necessário um tratamento eficiente destas águas de forma a remover os seus colóides, resíduos tóxicos, iões metálicos, impurezas e agentes causadores de doenças (como bactérias e vírus) (Tzoupanos & Zouboulis, 2008).

Um dos objetivos do tratamento físico e químico das águas para consumo público é reduzir os níveis totais de coliformes para valores inferiores a 1 coliforme/10 mL, evitando assim a transmissão de doenças infecciosas através da água. (Safe Drinking Water Committee *et al.*, 1982)

Atualmente, os processos utilizados para o tratamento de águas de consumo incluem (Hickey, 2008) (**Figura 1.1**): 1) Triagem - A água entra no sistema de tratamento e atravessa uma série de painéis, desenhados para remover alguns resíduos presentes na água, como galhos e folhas; 2) Pré-Sedimentação - Nesta etapa, ocorre a deposição de uma elevada quantidade de areia e de sedimentos presentes na água, enquanto esta flui lentamente dentro do reservatório; 3) Coagulação/Floculação - Esta etapa ocorre independentemente da origem da amostra tratada e é dividida em dois passos. O primeiro passo é designado de coagulação, no qual ocorre a destabilização de uma dada suspensão coloidal ou solução, através da adição de químicos apropriados - agentes coagulantes - como sais de alumínio ou ferro. Os agentes coagulantes adicionados apresentam carga positiva e neutralizam as cargas negativas das impurezas e de outras substâncias dissolvidas nas águas, formando assim partículas grandes. No segundo subprocesso, designado por floculação, ocorre a indução de partículas destabilizadas de forma a que se agreguem em grandes aglomerados (flocos), que podem ser facilmente separados através de decantação. O passo de coagulação-floculação é amplamente utilizado nos sistemas de tratamento dado a sua simplicidade e baixos custos (Tzoupanos & Zouboulis, 2008); 4) Sedimentação - Durante este processo, a água flui em bacias sedimentares e os flocos depositam-se no fundo do reservatório. Depois de aproximadamente 4 horas, cerca de 85% do material suspenso está depositado; 5) Filtração - Neste processo, a água existente no topo das bacias flui através de filtros de gravidade, atravessando camadas de pequenos fragmentos de carvão duro, areia e cascalho. Os filtros permitem remover as pequenas partículas em suspensão da água; 7) Desinfecção - Esta desinfecção pode ocorrer por tratamentos físicos, como irradiação Ultravioleta (UV) ou radiação ionizante e/ou químicos nomeadamente adição de cloro, hipoclorito de sódio, cloramina, ozono, entre outros, de forma a reduzir a sobrevivência e o crescimento dos microrganismos (Collins, Grange & Yates, 1984; Vaerewijck *et al.*, 2005). Os tratamentos químicos com cloro, cloramina, dióxido de cloro e outros compostos que apresentam cloro na sua constituição

têm sido usados com sucesso, ao longo de vários anos, nos processos de desinfecção das águas de consumo, pelo facto de serem agentes bactericidas extremamente potentes, sendo por isso, capazes de limitar o crescimento bacteriano nos sistemas de distribuição, tanto na fase plântica como em biofilmes (Le Dantec *et al.*, 2002; Batté *et al.*, 2004). Para além disso, a clorinação é um dos métodos de desinfecção mais baratos e fáceis de usar e o cloro permanece ativo no sistema durante um longo período de tempo (Ludovici, Phillips & Jeter, 1977), permitindo assim reduzir o risco de doenças transmitidas através das águas (Shrivastava, R. *et al.*, 2004); 8) Adição de aditivos – No passo final do tratamento adicionam-se aditivos à água, de forma a melhorar a sua qualidade. Alguns dos aditivos adicionados são o hidróxido de cálcio, para reduzir a corrosão das tubagens e dos equipamentos dos sistemas de distribuição de água e o carbono ativado para controlar o odor e o sabor das águas (Hickey, 2008).

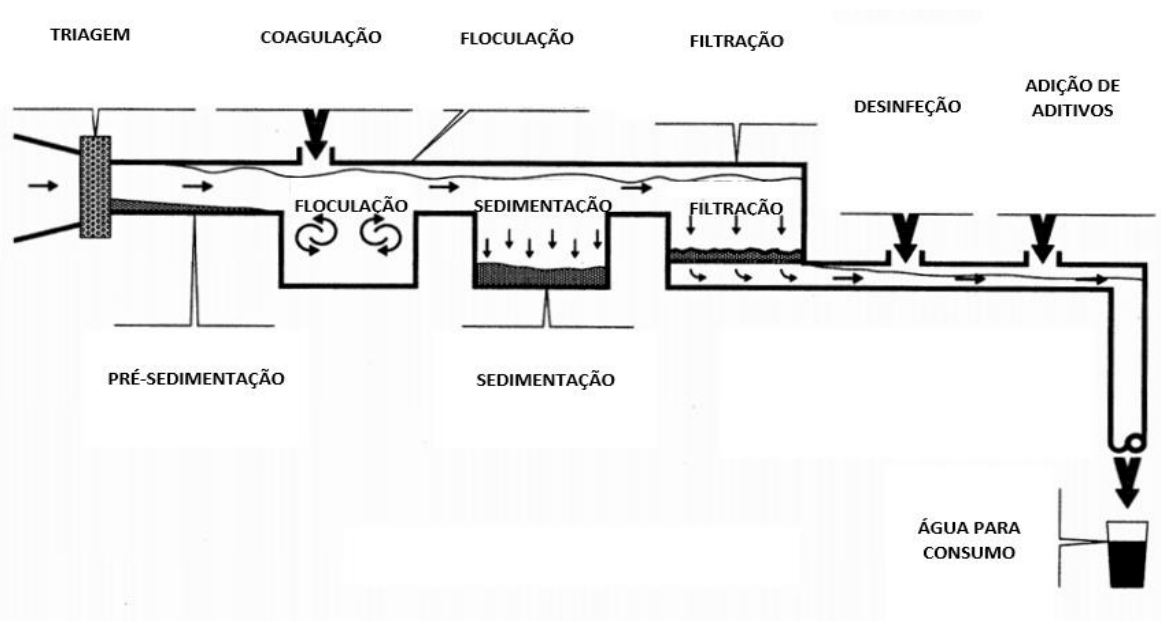


Figura 1.1 - Representação do processo de tratamento das águas para consumo: 1) Triagem - A água entra no sistema de tratamento e atravessa uma série de painéis, desenhados para remover alguns resíduos presentes na água, como galhos e folhas; 2) Pré-Sedimentação – Nesta etapa, ocorre a deposição de uma elevada quantidade de areia e de sedimento presentes na água, enquanto esta flui lentamente dentro do reservatório; 3) Coagulação/ Floculação - Adicionam-se substâncias coagulantes, como sulfato de alumínio, à água enquanto esta flui para bacias de sedimentação. Estas substâncias apresentam carga positiva e desta forma neutralizam as impurezas e outras partículas em suspensão de carga negativa, formando partículas de maiores dimensões, designadas de flocos. Posteriormente, ocorre a indução das partículas destabilizadas de forma a que se agreguem em grandes aglomerados (flocos), que podem ser facilmente separados através de decantação, sendo este processo designado por floculação; 4) Sedimentação - Durante este processo, a água flui em bacias sedimentares e os flocos depositam-se no fundo do reservatório. Depois de aproximadamente 4 horas, cerca de 85% do material suspenso está depositado; 5) Filtração - Neste processo, a água existente no topo das bacias flui através de filtros de gravidade, atravessando camadas de pequenos fragmentos de carvão duro, areia e cascalho. Os filtros permitem remover as pequenas partículas em suspensão da água; 7) Desinfecção – Nesta etapa, adiciona-se composto com cloro às águas para matar as bactérias e os vírus presentes na água. Em alguns casos adiciona-se amónia e cloro, que se combinam e formam compostos de cloramina. Estes compostos de cloramina podem ser usadas como desinfetantes secundários e são considerados mais estáveis e persistentes em comparação com a adição de cloro sozinho; 8) Adição de aditivos – No passo final do tratamento adicionam-se aditivos à água, de forma a melhorar a sua qualidade. Alguns dos aditivos adicionados são hidróxido de cálcio para reduzir a corrosão das tubagens e dos equipamentos dos sistemas de distribuição de água. É também adicionado carbono ativado para controlar o odor e o sabor das águas (Hickey, 2008) (Adaptado).

Para além dos processos físicos e químicos, referidos anteriormente, existem outros factores a ter em consideração e que estão sujeitos a monitorização e fiscalização, de forma a minimizar o crescimento de microrganismos no interior dos sistemas de distribuição de água. Estes fatores, abióticos e bióticos, influenciam o crescimento dos microrganismos dentro dos referidos sistemas bem como a eficácia dos processos de desinfecção referidos anteriormente.

Dentro dos fatores abióticos destacam-se: **Temperatura** - Este é um dos fatores mais importantes que influencia, direta e indiretamente, o crescimento microbiano, afetando sensivelmente todas as propriedades físicas e químicas da água. Para além de afetar a taxa de crescimento microbiano, a temperatura pode afetar a eficiência de desinfecção residual, a dissipação dos desinfetantes, taxa de corrosão e condições hidráulicas do sistema de distribuição (EPA, 1992). Desta forma, nos sistemas de distribuição a temperatura é mantida o mais baixa possível para minimizar o crescimento microbiano e consequentemente diminuir o risco de proliferação e sobrevivência de agentes patogénicos (Boe-Hansen, 2001); **pH** - Tal como a temperatura os valores de pH influenciam, direta e indiretamente, o crescimento microbiano. Nos sistemas de distribuição de água, o pH tende a ser o menor valor possível, dentro dos critérios de qualidade da água. Isto porque, valores de pH reduzidos limitam o crescimento microbiano e evitam a corrosão dos materiais dos sistemas de distribuição de água (Ratnayaka, Brandt & Johnson, 2009); **Concentração de cloro**: As águas destinadas ao uso humano são sujeitas a tratamentos químicos, nomeadamente através da adição de cloro, hipoclorito de sódio e cloramina, de forma a reduzir a sobrevivência e o crescimento dos microrganismos (Collins, Grange & Yates, 1984; Vaerewijck *et al.*, 2005a). O ácido hipocloroso é um oxidante altamente destrutivo que reage com vários compostos celulares e afeta processos metabólicos, devido à (Dantec *et al.*, 2002; Batté *et al.*, 2004; Shrivastava *et al.*, 2004): 1) formação *in vitro* de derivados de cloro de purinas e pirimidinas (Dennis *et al.*, 1979); 2) descarboxilação oxidativa de aminoácidos (Pereira *et al.*, 1973); 3) inibição de enzimas envolvidas no metabolismo intermediário (Knox *et al.*, 1948); 4) inibição da biossíntese de proteínas (Benarde, Snow & Olivieri, 1967); 5) introdução de lesões numa ou nas duas cadeias dos cromossomas bacterianos (Shih & Lederberg, 1976); 6) produção de mutações (Shih & Lederberg, 1976); 7) inibição de processos de transporte ativo mediado por membrana e atividade respiratória (Camper & Mcfeters, 1979); 8) Reação com os ácidos gordos insaturados da membrana e consequentemente alteração da fluidez e da permeabilidade da mesma (Le Dantec *et al.*, 2002), entre outros.

Dos fatores bióticos que afetam o crescimento microbiano, destaca-se a **Concentração de matéria orgânica biodegradável** (este parâmetro inclui o carbono orgânico dissolvidos biodegradável e o carbono orgânico assimilável): A quantidade de nutrientes existente nas águas dos sistemas de distribuição afeta o crescimento microbiano e a produção de biofilmes. Para garantir o seu crescimento e energia, os microrganismos necessitam de uma fonte de matéria orgânica biodegradável, bem como fósforo, amónia e outros nutrientes essenciais (EPA, 1992; Lechevallier, 1999). Esses nutrientes tendem a concentrar-se na interface sólido-líquido, criando assim um ambiente favorável para a formação e desenvolvimento dos biofilmes (Lechevallier, 1999). A água presente nos sistemas de distribuição apresenta uma concentração de nutrientes reduzida dado que são sujeitas a tratamentos de remoção do carbono orgânico assimilável, observando-se assim uma diminuição do crescimento microbiano e destacamento dos biofilmes produzidos (Hunt *et al.*, 2004; Vaerewijck *et al.*, 2005).

As redes de distribuição de água municipais são atualmente reconhecidas como um dos maiores reservatórios de MNT (Wallace, Brown & Griffith, 1998). As (mico)bactérias podem entrar nos sistemas de distribuição de água através de várias vias nomeadamente, através de fugas nas tubagens, válvulas, junções, entre outras, ou através de deficiências das infraestruturas dos sistemas de distribuição (Vaerewijck *et al.*, 2005).

Os primeiros relatos de isolamento de micobactérias em sistemas de distribuição de água começaram em 1900. Brem (1909) reportou a presença de organismos ácido-álcool resistentes em águas da torneira (Brem, 1909). A partir dos anos 60, começou a surgir a preocupação e consequentemente a procura de espécies de *Mycobacterium* em sistemas de distribuição de água (Collins, Grange & Yates, 1984).

Kubika et al. (1963) encontraram várias estirpes de “bacilos ácido-álcool resistentes não-classificados” em amostras de água. (Kubica, Beam & Palmer, 1963).

Em 1970, *Bailey* isolou *Mycobacterium kansasii* a partir de água da torneira nos EUA (*Bailey et al.*, 1970). No mesmo ano, *Bullin* isolou *Mycobacterium xenopi* de 61 dos 111 pares de torneiras quentes e frias de um hospital, 20 de 74 de outro e apenas 3 de 61 pares num terceiro hospital (*Bullin, Tanner & Collins*, 1970). Isto permitiu concluir que estas espécies ocorrem principalmente em torneiras de água quente, tendência esta que também foi observada por *McSwiggan* e *Collins*, em Inglaterra, onde foram isoladas 18 estirpes de *M. kansasii* e seis estirpes de *M. xenopi* a partir de 65 torneiras diferentes de um hospital (*McSwiggan & Collins*, 1974).

Paull (1973), isolou várias estirpes de micobactérias de rápido crescimento de amostras de água de torneiras, no Reino Unido (*Paull*, 1973). Outros estudos semelhantes também isolaram *Mycobacterium kansasii* e *Mycobacterium xenopi* em diferentes tipos de localizações (*Dizon, Mihailescu & Bae*, 1976; *Steadham*, 1980; *Maniar & Vanbuckenhout*, 1976).

Para além destas, outras espécies diferentes foram identificadas, observando-se que um total de 33 % (46/139), 21.3 % (42/197) e 72 % (104/144) das amostras dos sistemas de distribuição de água nos EUA, Patras (Grécia) e Paris (França), respetivamente, apresentavam espécies do género *Mycobacterium* (*Covert et al.*, 1999; *Tsintzou et al.*, 1999; *Le Dantec et al.*, 2002).

É esperado que as MNT sejam removidas dos sistemas de distribuição ao longo dos diferentes tratamentos, tanto físicos como biológicos (por exemplo predação), contudo observa-se que estes tratamentos não são totalmente eficazes, sendo detetada a presença de micobactérias não-tuberculosas em águas de consumo (*Vaerewijck et al.*, 2005), como observado pelos estudos anteriormente referidos. Esta capacidade de resistência das micobactérias aos diferentes processos de tratamento deve-se em grande parte às suas características fisiológicas, nomeadamente à sua parede celular característica e à sua capacidade de formar biofilmes (*Vaerewijck et al.*, 2005).

1.5. Parede Celular

As micobactérias apresentam uma parede celular substancialmente mais espessa do que a maioria das outras bactérias, caracterizada pela presença de uma elevada quantidade de lípidos e consequentemente uma elevada hidrofobicidade, (*Brennan & Nikaido*, 1995; *Daffé & Draper*, 1997; *Kenneth & Ray*, 2004). A parede celular das micobactérias é, provavelmente, a característica mais notável destes microrganismos. (*Brennan*, 2003)

A parede celular destas bactérias é composta maioritariamente por três macromoléculas (**Figura 1.2**): peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos (Brennan & Nikaido, 1995; Alderwick *et al.*, 2015). Estes três constituintes estão ligados covalentemente e organizados num complexo peptidoglicano-arabinogalactano-micolil, formando assim o esqueleto da parede celular (Brennan & Nikaido, 1995; Dmitriev *et al.*, 2000).

Este tipo de parede celular é constituída por camadas finas de peptidoglicanos, que são compostas por resíduos alternados de N-acetilglucosamina e ácido N-glicolilmurâmico ligados por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, sendo que as cadeias laterais dos péptidos estão ligadas aos resíduos de ácido N-glicolilmurâmico (Dmitriev *et al.*, 2000). Nas outras bactérias Gram positivas, os resíduos de ácido N-glicolilmurâmico são substituídos por resíduos de ácido N-acetilmurâmico (Kenneth & Ray, 2004).

A camada de peptidoglicano é uma estrutura versátil, rígida o suficiente para funcionar como esqueleto e permitindo assim, à bactéria, manter a sua forma e protegê-la contra a pressão osmótica, mas, ao mesmo tempo, maleável o suficiente para permitir o crescimento e expansão da mesma (Santos, 2016).

À camada de peptidoglicano está ligada uma camada de arabinogalactano, o maior polissacárido da parede celular micobacteriana, que é um heteropolissacárido altamente ramificado constituído por uma cadeia linear de galactano e duas ou três oligossacáridos de arabinose, como cadeias laterais (Dmitriev *et al.*, 2000).

Esta camada por sua vez está ligada covalentemente a uma camada de ácidos micólicos (Brennan and Nikaido, 1995; Martínez, Torello & Kolter, 1999). Os ácidos micólicos, mistura complexa de longas cadeias de ácidos gordos β -hidroxi α -ramificados (Martínez, Torello & Kolter, 1999), são responsáveis pelo nome do género *Mycobacterium* e constituem mais de 60 % da massa total da parede celular das micobactérias e são característicos para cada espécie (Kenneth & Ray, 2004).

Desta forma, as camadas iniciam-se com peptidoglicano e terminam com ácidos micólicos. Este complexo é solúvel e é um núcleo essencial da parede celular das micobactérias (Brennan, 2003; Hett & Rubin, 2008). Esta parede celular é rodeada por uma cápsula de polissacáridos, proteínas e pequenas quantidades de lípidos ligados não-covalentemente, que inclui glicopeptidolipidos específicos de -tipo e de -espécie (GPLs) e glicolípidos fenólicos (Martínez, Torello & Kolter, 1999). Os GPLs apresentam um papel importante na motilidade e formação de biofilmes, através de interações eletrostáticas entre a cápsula micobacteriana e as superfícies abióticas (Recht *et al.*, 2000; Recht & Kolter, 2001).

A estrutura não-usual da parede das micobactérias confere-lhes uma impermeabilidade notável a substâncias externas, sendo um determinante crítico de virulência para estes organismos (Martínez, Torello & Kolter, 1999). As condições de crescimento afetam a composição da parede celular das micobactérias, nomeadamente a sua composição lipídica e de ácidos micólicos (Archuleta, Mullens & Primm, 2002). A resistência natural das micobactérias está relacionada, em parte, com os mecanismos

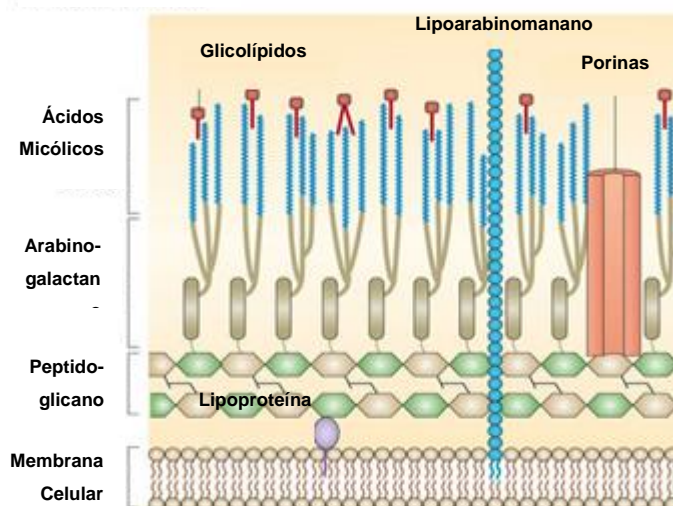


Figura 1.2 - Estrutura da parede celular das micobactérias (Adaptado) (Brown *et al.*, 2015).

que afetam o conteúdo, hidrofobicidade e desta forma a permeabilidade da parede celular (Van Ingen *et al.*, 2012).

1.6. Biofilmes

A patogenicidade das micobactérias está intimamente relacionada com a sua acumulação e consequente formação de agregados polimicrobianos em interfaces, nomeadamente os biofilmes (Wingender, Neu & Flemming, 1999; Allison, 2003) - consórcios microbianos que aderem a superfícies bióticas e abióticas. Aquando da aderência às interfaces, as células começam a formar micro-colónias e produzem substâncias poliméricas extracelulares (Bardouniotis, Ceri & Olson, 2003; Rasamiravaka *et al.*, 2015).

Estas substâncias poliméricas são principalmente polissacáridos, proteínas, ácidos nucleicos e lípidos, que conferem estabilidade mecânica ao biofilme, permitindo a adesão às superfícies e a formação de uma rede coesiva e tridimensional polimérica, que interconecta e transientemente imobiliza as células do biofilme (Wingender, Neu & Flemming, 1999; Allison, 2003; Rasamiravaka *et al.*, 2015).

A formação dos biofilmes envolve várias etapas (Davey & O'toole, 2000; Watnick & Kolter, 2000): (1) A formação de uma película de condicionamento, que altera as propriedades da superfície e por sua vez influencia a adesão das bactérias à superfície respetiva; (2) Adesão reversível dos microrganismos à superfície; (3) adesão irreversível; (4) formação de microcolónias; (5) formação de biofilmes (Vaerewijck *et al.*, 2005; Stevenson *et al.*, 2015).

A formação de biofilmes é considerada uma estratégia universal das bactérias para resistir a fatores ambientais adversos (Barbeau, Gauthier & Payment, 1998; Vaerewijck *et al.*, 2005). Vários autores demonstraram a capacidade de as micobactérias produzirem ou viverem em biofilmes em ambientes aquáticos, nomeadamente sistemas de distribuição de água (Schulze-Robbeke & Buchholtz, 1992; Schwartz *et al.*, 1998; Falkinham III, Norton & Mark, 2001).

Contudo, os mecanismos subjacentes à formação de biofilmes pelas micobactérias ainda não é completamente compreendido (Vaerewijck *et al.*, 2005). Os microrganismos utilizam estruturas como flagelos, pili, fímbrias, surfactantes ou cápsulas para atingir e aderir às superfícies. Contudo, dado que as micobactérias não apresentam as estruturas referidas, estas bactérias difundem-se nas superfícies por mecanismo de *sliding*. Esta forma de motilidade desempenha um papel crucial na colonização de superfícies no ambiente bem como nos hospedeiros (Martínez, Torello & Kolter, 1999).

A capacidade de as micobactérias formarem biofilmes em diferentes superfícies, deve-se em grande parte à natureza hidrofóbica da parede celular (devido ao seu elevado conteúdo lipídico), que facilita a adesão às superfícies, bem como à sua resistência a metais pesados, desinfetantes e antibióticos (Schulze-Röbbecke, Janning and Fischeder, 1992; Falkinham III, 2002; Torvinen *et al.*, 2007).

As micobactérias embebidas em biofilmes apresentam uma maior resistência contra agentes antimicrobianos do que as células planctónicas (Bardouniotis *et al.*, 2001; Bardouniotis, Ceri & Olson, 2003), dado que há uma entrada restrita dos antimicrobianos nos biofilmes, baixa taxa de crescimento e expressão de possíveis genes de resistência específicos de biofilmes (Lewis, 2001; Thien-fah & Toole, 2001). Desta forma, as micobactérias em biofilmes constituem um risco para a saúde humana.

Os biofilmes nos sistemas de distribuição de água podem ser responsáveis por uma elevada variedade de problemas operacionais e de qualidade da água, dado que podem ser responsáveis pela perda de resíduos de desinfetantes nos sistemas de distribuição, aumento dos níveis bacterianos, redução do oxigénio dissolvido, alterações no sabor e odor, entre outros (Characklis & Marshall, 1990).

O estudo das resistências das MNT nas águas dos sistemas de distribuição é crucial para melhorar a eficácia dos processos de desinfecção utilizados nestes sistemas e consequentemente garantir a qualidade das águas de consumo. Apesar do crescente estudo e preocupação com a presença de micobactérias nos sistemas de distribuição de água, é ainda desconhecido como é que diferentes micobactérias se comportam na presença de diferentes tipos de stress. Este trabalho tenta, por isso, aumentar o conhecimento sobre o comportamento das MNT face a factores de stress presentes nos sistemas de distribuição, como temperatura, pH, cloro e privação de nutrientes.

2. Objetivos

Esta dissertação tem como objetivo estudar como micobactérias não-tuberculosas, isoladas a partir de diferentes locais, se comportam nos sistemas de distribuição de água. Desta forma, pretende-se analisar como estas bactérias respondem perante as diferentes condições encontradas nestes sistemas, nomeadamente em relação à temperatura, pH, concentração de cloro e privação de nutrientes. Outro dos objetivos deste trabalho é estudar a permeabilidade das micobactérias ao longo de diferentes tipos de solos e consequentemente perceber os mecanismos envolvidos na contaminação de lençóis freáticos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Crescimento dos isolados de MNT em estudo

Os isolados de MNT utilizados ao longo deste trabalho foram disponibilizados e pertencem ao Laboratório de Análises do Instituto Superior Técnico. Os isolados em estudo foram plaqueados em *Middlebrook 7H9 Broth* (MB) (*BD Biosciences, EUA*) e incubadas a 37 °C até se obter crescimento confluyente. Posteriormente, foram guardadas a 4 °C até à sua utilização.

3.2. Extração DNA

A extração do DNA dos diferentes isolados foi feita com o *Genolyse Kit* (*Hain LifeScience, Alemanha*), seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, misturou-se uma igual quantidade de isolado (50 µL) e de reagente de lise seguido de incubação, durante 15 min, a 95 °C em banho seco (*Grant Instruments, Reino Unido*). Após este período, adicionou-se o mesmo volume de reagente de neutralização e misturou-se com uma pipeta. O DNA extraído de cada isolado foi guardado a -20 °C até à sua utilização.

3.3. Identificação dos isolados de MNT em estudo

Para a identificação dos isolados de MNT em estudo, procedeu-se à amplificação por PCR do gene rRNA 16S, dos isolados, usando os *primers* Sp1 (5'- ACC TCC TTT CTA AGG AGC ACC-3') (*Metabion International, Alemanha*) e Sp2 (5'- GAT GCT CGC AAC CAC TAT CCA-3') (*Metabion International, Alemanha*). Para esta amplificação recorreu-se ao *Veriti Thermal Cycler* (*Applied Biosystems, EUA*), sendo as condições utilizadas as descritas por Roth (Roth *et al.*, 1998): desnaturação durante 5 min a 95 °C, seguido de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 40 s de *annealing* a 62 °C e 40s de extensão a 72 °C, durante 38 ciclos. A cada 5 µL de suspensão bacteriana adicionou-se 12.5 µL de *Maxime Hot Start Green* (*Thermo Fisher Scientific, EUA*), 1 µL de cada um dos *primers* escolhidos e 5,5 µL de água destilada sem DNases. Para o controlo negativo adicionou-se 5 µL de água destilada estéril ao invés do DNA do isolado.

Para confirmar a presença de produtos amplificados, fez-se uma eletroforese em gel de agarose 2.5 % (*Seakem LE Agarose Lonza, EUA*) e os produtos de PCR foram visualizados num transiluminador (UVITEC, Reino Unido). As bandas de amplificação foram removidas do gel e o DNA foi purificado e concentrado utilizando o *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE healthcare, EUA)*, seguindo o protocolo do fabricante. Posteriormente, o DNA purificado foi enviado para um laboratório comercial (*DNA Sequencing services, University of Dundee*) onde foi feita a sequenciação. As sequências obtidas para cada isolado foram comparadas com bases de dados de sequências atuais (*GenBank*) usando o *NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* para determinar relações filogenéticas. Os resultados obtidos encontram-se sintetizados na **Tabela 3.1**:

Resistência de espécies de *Mycobacterium* a diferentes condições de *stress* relacionadas com o tratamento de água

Tabela 3.1 – Origem, características físico-químicas e identificação das espécies de *Mycobacterium* utilizadas neste trabalho experimental; * - Inconclusivo.

Origem do isolado	Características físico-químicas			Espécies de <i>Mycobacterium</i> isoladas	
	Tipo	Temperatura	pH	Designação do isolado	Espécie
<i>Yellowstone National Park (EUA)</i>	Solo	-	-	NPS001	<i>M.avium</i>
<i>Yellowstone National Park (EUA)</i>	Vegetação	-	-	NPS003	<i>M.avium</i>
<i>Yellowstone National Park (EUA)</i>	Água	34.6	3.0	NPS006	<i>M. parascrofulaceum</i>
<i>Yellowstone National Park (EUA)</i>	Fezes	-	-	NPS007	<i>M. parascrofulaceum</i>
<i>Yellowstone National Park (EUA)</i>	Água	17.4	1.7	NPS008	<i>M. gordonae</i>
<i>Yellowstone National Park (EUA)</i>	Água	7.6	6.5	NPS013	<i>M.avium</i>
<i>Yellowstone National Park (EUA)</i>	Água	8.4	7.8	NPS017	<i>M.parascrofulaceum</i>
<i>Yellowstone National Park (EUA)</i>	Água	-	-	NPS023	<i>Mycobacterium</i> spp.
<i>Yellowstone National Park (EUA)</i>	Solo	-	-	NPS048	<i>M.avium</i>
<i>Glacier National Park (EUA)</i>	Solo	-	-	NPS058	<i>Mycobacterium</i> spp.
<i>Glacier National Park (EUA)</i>	Água	8.5	8.0	NPS067	<i>Mycobacterium</i> spp.
<i>Yellowstone National Park (EUA)</i>	Água	4306	4.4	NPS081	<i>Mycobacterium</i> spp.
<i>Yellowstone National Park (EUA)</i>	Água	43.2	3.1	NPS087	<i>M. parascrofulaceum</i>
<i>Yellowstone National Park (EUA)</i>	Água	56.1	3.0	NPS089	<i>Mycobacterium</i> spp.
<i>Yellowstone National Park (EUA)</i>	Água	75.4	2.1	NPS091	<i>Mycobacterium</i> spp.
<i>Yellowstone National Park (EUA)</i>	Água	26.0	2.2	NPS093	<i>M.gordonae</i>
<i>Glacier National Park (EUA)</i>	Água	3.5	9.8	NPS113	<i>M. avium</i>
<i>Glacier National Park (EUA)</i>	Água	11.5	9.0	NPS115	<i>Mycobacterium</i> spp.
<i>Glacier National Park (EUA)</i>	Água	15.8	8.8	NPS116	<i>Mycobacterium</i> spp.
<i>Glacier National Park (EUA)</i>	Água	6.7	8.1	NPS127	<i>Mycobacterium</i> spp.
<i>Glacier National Park (EUA)</i>	Água	3.7	7.6	NPS129	<i>M.chelonae</i>
<i>Glacier National Park (EUA)</i>	Água	3.7	7.6	NPS130	<i>Mycobacterium</i> spp
<i>Yellowstone National Park (EUA)</i>	Água	48.0	2.2	NPS154	<i>M. kansasii</i>
<i>Glacier National Park (EUA)</i>	Água	7.6	3.7	NPS170	<i>M.gordonae</i>
<i>Glacier National Park (EUA)</i>	Água	9.0	8.4	NPS184	<i>Mycobacterium</i> spp.

Resistência de espécies de *Mycobacterium* a diferentes condições de *stress* relacionadas com o tratamento de água

Glacier National Park (EUA)	Água	8.2	8.2	NPS189	<i>Mycobacterium</i> spp.
Yellowstone National Park (EUA)	Água	34.7	2.5	NPS203	<i>M. avium</i>
Yellowstone National Park (EUA)	Água	36.6	2.2	NPS213	<i>M. parascrofulaceum</i>
Glacier National Park (EUA)	-	-	-	NPS287	*
Yellowstone National Park (EUA)	-	-	-	207B	*
Doente canadiano (estirpe clínica)	-	-	-	DSMZ 44848	<i>M. parascrofulaceum</i>
Doente italiano (estirpe clínica)	-	-	-	03077	<i>M. parascrofulaceum</i>
Cultura de referência (ATCC 700084)	-	-	-	SMG	<i>M. smegmatis</i>
Yellowstone National Park (EUA)	-	-	-	101B	<i>M. avium</i>
Sistema de água tratada	-	-	-	M.F. 22723	<i>M. fortuitum</i>
Sistema de água tratada	-	-	-	M.F. 22724	<i>M. fortuitum</i>
Sistema de água tratada	-	-	-	M.F. 22725	<i>M. fortuitum</i>
Sistema de água tratada	-	-	-	M.F.22726	<i>M. fortuitum</i>

3.4. Ensaio de crescimento de isolados a diferentes temperaturas

Para este estudo foram escolhidos 24 isolados: NPS 003, NPS 006, NPS 007, NPS 008, NPS 013, NPS 023, NPS 048, NPS 081, NPS 091, NPS 115, NPS 116, NPS 129, NPS 213, NPS 287, 101B, 207B, NPS 127, 03077, DSMZ 44848, SMG, NPS 087, NPS 189, NPS 203, NPS 017, para estudar e comparar o crescimento das micobactérias em diferentes temperaturas: 8 °C, 20 °C, 37 °C, 44 °C e 60 °C.

Para o estudo de crescimento dos isolados escolhidos a diferentes temperaturas foram feitos dois ensaios em paralelo, um no qual se utilizaram suspensões de micobactérias em água destilada (H₂O) e no outro em MB.

3.4.1. Inoculação de isolados de MNT

Os isolados de micobactéria escolhidos foram crescidos em MB até se obter colónias visíveis. De seguida, as células foram recolhidas com uma ansa e suspensas em 5 mL de MB ou H₂O até atingir uma densidade óptica (DO) de 0.6 (a 600 nm). Os isolados (100 µL) foram plaqueados por espalhamento em placas de MB e incubadas às diferentes temperaturas de estudo: 8 °C, 20 °C, 37 °C, 44 °C e 60 °C, durante 30 dias para determinar a sua viabilidade.

3.4.2. Quantificação da concentração total de proteínas (µg/mL) das células bacterianas

Para proceder à determinação da concentração total de proteínas (µg/mL) de cada isolado em estudo, recorreu-se ao *Kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, EUA)*, seguindo o protocolo do fabricante.

Resumidamente, inicialmente, preparam-se soluções com padrão de *Bovine serum albumin* (BSA), de forma a traçar uma curva de calibração: Concentração de proteína (µg/mL) versus Absorvância (a 562

nm). De seguida, adicionou-se 25 µL de cada uma das soluções de BSA a 200 µL de reagente de reação, numa placa de 96 poços. Leu-se a absorvância, a 562 nm, para cada uma das soluções de BSA, ao fim de 30 min de incubação a 37 °C, com recurso ao *Varioskan Flash* (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Paralelamente, os isolados de MNT em estudo foram crescidos em MB até se obter colónias visíveis. Com o auxílio de uma ansa, suspendeu-se estas células em 5 mL de MB ou de H₂O até atingir uma DO de 0.6 (a 600 nm). As suspensões foram incubadas às diferentes temperaturas de estudo: 8 °C, 20 °C, 37 °C, 44 °C e 60 °C - durante 20 dias. Posteriormente, adicionou-se 25 µL de cada uma destas soluções de MNT a 200 µL de reagente de reação, numa placa de 96 poços. Por fim, leu-se a absorvância a 562 nm para cada uma dos isolados, ao fim de 30 min de incubação a 37 °C, com recurso ao *Varioskan Flash* (Thermo Fisher Scientific, EUA). Recorrendo à curva de calibração obtida, e tendo em consideração os valores de absorvância (a 562 nm), determinou-se a concentração total de proteína (µg/mL) para cada isolado.

Este ensaio de quantificação de proteína é baseado na reação de biureto, isto é, a redução de iões cobre (II) (Cu²⁺) a iões cobre (I) (Cu⁺) pelas proteínas numa solução alcalina, sendo esta uma deteção dependente da concentração dos iões monovalentes produzidos. A reação cromogénica existente neste ensaio é a quelação de um ácido bicinonínico com o cobre reduzido, produzindo um complexo purpura com forte absorvância a 562 nm.

3.5. Ensaio de crescimento de isolados a diferentes pHs

Para este estudo foram escolhidos 7 isolados: NPS 017, M.F. 22723, DSMZ 44848, SMG, 207B, NPS 203, NPS 129 para estudar e comparar o crescimento de micobactérias a diferentes valores de pH: Soluções de ácido clorídrico (HCl) com pH entre 0-5; Soluções de ácido sulfúrico (H₂SO₄) com pH entre 0-5 e soluções básicas de hidróxido de sódio (NaOH) com pH entre 7-14.

À semelhança do ensaio de temperatura, também foram realizados dois ensaios em paralelo um no qual as soluções com diferentes valores de pH e as suspensões de MNT foram preparadas com água e noutro com MB.

3.5.1. Inoculação de isolados de MNT

Os 7 isolados de MNT foram crescidos em placas de MB até se obter colónias visíveis. Posteriormente, com o auxílio de uma ansa, suspendeu-se estas células em 5 mL de MB ou de H₂O até atingir uma DO de 0.6 (a 600 nm). Posteriormente, adicionou-se 50 µL da referida suspensão a soluções de MB ou H₂O com o valor de pH previamente ajustado, entre 0-5 com HCl 37% (*Honeywell*, EUA) e H₂SO₄ 4% (*Sigma-Aldrich*, EUA) e entre 7-13 com NaOH 1M (*Fluka Analytical*, EUA). Os isolados (100 µL) foram plaqueadas por espalhamento em placas de MB ao fim de 5 min e 1020 min de exposição e incubadas a 37 °C durante 20 dias de forma a determinar a sua viabilidade.

3.5.2. Quantificação da concentração total de proteínas (µg/mL) das células bacterianas

Para proceder à determinação da concentração total de proteínas (µg/mL) de cada isolado em estudo, recorreu-se ao *Kit Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific, EUA), seguindo o protocolo do fabricante.

Resumidamente, inicialmente, preparou-se soluções com padrão de *Bovine serum albumin* (BSA), de forma a traçar uma curva de calibração - Concentração de proteína (µg/mL) versus Absorvância (a 562 nm). De seguida, adicionou-se 25 µL de cada uma das soluções de BSA a 200 µL de reagente de reação, numa placa de 96 poços. Leu-se a absorvância a 562 nm para cada uma das soluções padrão, ao fim de 30 min de incubação a 37 °C, com recurso ao *Varioskan Flash* (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Paralelamente, os isolados de MNT em estudo foram crescidos em MB até se obter colónias visíveis. Com o auxílio de uma ansa, suspendeu-se estas células em 5 mL de MB ou de H₂O até atingir uma DO de 0.6 (a 600 nm). Posteriormente, adicionou-se 50 µL das suspensões de MNT a soluções de MB ou H₂O com o valor de pH previamente ajustado, entre 0-3 com HCl 37% (*Honeywell Fluka, EUA*) e H₂SO₄ 4% (*Sigma-Aldrich, EUA*) e entre 11-13 com NaOH 1M (*Fluka Analytical*). As suspensões foram incubadas à temperatura ambiente, durante 1020 min. Posteriormente, adicionou-se 25 µL de cada uma destas soluções de MNT a 200 µL de reagente de reação, numa placa de 96 poços. Por fim, leu-se a absorvância a 562 nm para cada uma dos isolados, ao fim de 30 min de incubação a 37 °C, com recurso ao *Varioskan Flash* (*Thermo Fisher Scientific, EUA*). Recorrendo à curva de calibração obtida, e tendo em consideração os valores de absorvância, determinou-se a concentração total de proteína (µg/mL) para cada isolado.

Este ensaio de quantificação de proteína é baseado na reação de biureto, isto é, a redução de iões cobre (II) (Cu²⁺) a iões cobre (I) (Cu⁺) pelas proteínas numa solução alcalina, sendo esta uma deteção dependente da concentração dos iões monovalentes produzidos. A reação cromogénica existente neste ensaio é a queação de um ácido bicinonínico com o cobre reduzido, produzindo um complexo purpura com forte absorvância a 562 nm.

3.6. Ensaio de crescimento a diferentes concentrações de Cloro

Para este estudo foram escolhidos 5 isolados: NPS 017, SMG, 207B, M.F. 22723 e DSMZ 44848. Neste trabalho foram feitos dois ensaios em paralelo, um no qual se fizeram suspensões das MNT e as soluções com hipoclorito de sódio -NaClO- (*Merck, Alemanha*) em água destilada e no outro em MB.

Primeiramente, prepararam-se soluções de hipoclorito de sódio com concentrações de 1, 2, 5, 7 e 10 ppm, sendo estes valores medidos com recurso ao *Analytic* (*LoviBond, Reino Unido*).

Paralelamente, os 5 isolados de MNT foram crescidos em MB até se obter colónias visíveis. De seguida, com o auxílio de uma ansa, suspenderam-se estas células em 5 mL de MB ou de H₂O até atingir uma DO de 0.6 (a 600 nm).

Às soluções com diferentes concentrações de cloro, previamente preparadas, adicionou-se 100 µL das suspensões de MNT e plaqueou-se em placas de MB, ao fim dos diferentes tempos de exposição em escolhidos: 10 min, 30 min, 2 h e 3 h. Por fim, as placas foram incubadas a 37 °C, durante 30 dias.

3.7. Ensaio de crescimento em condições de privação de nutrientes

Para este estudo foram escolhidos 7 isolados: NPS 203, NPS 129, 207B, SMG, DSM 44848, M.F. 22723 e NPS 017.

3.7.1. Produção de ATP

A concentração intracelular de ATP (p/mL) foi quantificada com recurso ao *ATP Determination Kit* (*Thermo Fisher scientific, EUA*), de acordo com as instruções do fabricante.

Primeiramente, preparam-se soluções com diferentes concentrações de ATP (p), de forma a traçar uma curva de calibração: Quantidade de ATP (p) *versus* Luminescência (560 nm). De seguida, misturou-se 10 µL de cada uma das soluções de ATP com 100 µL de Solução de Reação *Standard*, previamente preparada, em placas de 96 poços. A luminescência emitida a 560 nm, por cada solução, foi detetada através do *Varioskan* (*Thermo Fisher Scientific, EUA*), e apresentado como unidades de luz relativas (r.l.u.).

Posteriormente, detetou-se a luminescência a 560 nm, para cada um dos isolados em estudo. Para isso, misturou-se 10 µL de cada isolado de MNT pré-inativada (90 °C, 20 min) (Gengenbacher *et al.*, 2010) com 100 µL de Solução de Reação *Standard*, previamente preparada, em placas de 96 poços. A luminescência emitida a 560 nm, por cada isolado de MNT, foi detetada através do *Varioskan* (*Thermo Fisher Scientific, EUA*), e apresentado como unidades de luz relativas (r.l.u). Posteriormente, com recurso à curva de calibração obtida, e tendo em consideração os valores de absorvância a 560 nm, determinou-se a concentração total de ATP (p) para cada isolado.

As leituras foram correlacionadas diretamente com o conteúdo de ATP dos respetivos isolados. Todos os ensaios foram normalizados usando soluções de ATP entre 0.05 M e 0.5 M como controlo interno.

3.7.2. Microscopia de Fluorescência Auramina-Rodamina

Inicialmente, com recurso à *Centrifuge MiniSpin* (*eppendorf, Alemanha*) centrifugou-se 100 µL de cada isolado durante 5 min a 12000 rpm e de seguida ressuspendeu-se o *pellet* em 100 µL de água destilada estéril. Posteriormente, espalhou-se 50 µL deste concentrado numa lâmina e aqueceu-se à chama até secar. Após a fixação por calor, a lâmina foi alagada com corante Auramina-Rodamina (*BD Biosciences, EUA*) e deixada à temperatura ambiente 15 min. Após este período, a lâmina foi lavada com água destilada para remover o corante em excesso e alagada com reagente descolorante (700 mL de Isopropanol (*Honeywell Fluka, EUA*), 300 mL de água destilada, 5 mL de ácido hidrocloreídrico (*Sigma-Aldrich, EUA*) e finalmente, lavada com água destilada para remover o reagente descolorante. As lâminas foram então alagadas com corante de contagem permanganato de potássio 0.5% (*Biostain, Austrália*), e deixadas 5 min à temperatura ambiente, lavadas com água destilada e secas ao ar. As lâminas coradas foram observadas com *Nikon Eclipse E400 Microscope* (*Nikon, Japão*) equipado com um filtro azul fluorescente e uma câmara digital, *Nikon Digital Sight*, (*Nikon, Japão*). Os isolados foram analisados com amplificação total de 400x.

3.7.3. Ensaio PCR Tempo Real

A quantificação dos isolados em estudo foi feita com recurso ao *7300 Real Time PCR System*, utilizando *primers* que amplificam a região 16S-23S rRNA *Gene Spacer*. Os *primers* utilizados foram myc_spp01 (5'-TAG GTC GGG ACG GTG AG- 3') (*Metabion International, Alemanha*) e myc_spp02 (5'- TTG CGA AGT GAT TCC TCC -3') (*Metabion International, Alemanha*) e a sonda myc_spp_P (6-Fam-CGT CCG TCG CGG GCR CTG MRC- BHQ-1) (*Metabion International, Alemanha*), (detetada através do canal FAM).

As condições de PCR utilizadas foram as seguintes: desnaturação inicial durante 10 min a 95 °C, 40 ciclos com 1 min de desnaturação a 95 °C, seguidos de 1 min a 60 °C (passo de *annealing* e extensão). A cada 5 µL de suspensão bacteriana adicionou-se 12.5 µL de *Maxima Probe Rox PCR qPCR* (*Thermo Fisher Scientific, EUA*), 0.2 µL de cada um dos *primers* escolhidos, 0.05 µL da sonda e 7.05 µL de água estéril livre de DNAses. Para o controlo negativo adicionou-se 5 µL de água estéril livre de DNAses ao invés do DNA bacteriano. Os valores de concentração (UG/mL) para cada isolado, foram determinados através da curva-padrão obtida, usando um controlo positivo de DNA a concentrações conhecidas.

3.8. Permeação através de superfícies

Este ensaio tentou mimetizar a quantidade de água, por m², resultante da precipitação nos meses de Inverno (Outubro a Março) e de Verão (Junho a Setembro), por ano, em Portugal. Para isto, foram tidos em consideração os valores médios de precipitação (mm) nos referidos meses, nos anos de 2015/2016 e 2016/2017, em Portugal (IPMA, 2017).

Para este ensaio fez-se passar 5 mL de *Mycobacterium segmatis* (DO= 0.6 a 600 nm) através de uma coluna de areia e de uma coluna de pedras. Com recurso a uma bomba peristáltica *Easy-Load II MasterFlex* (MasterFlex, EUA) irrigou-se as colunas com 3 L de água destilada (ensaio de verão) e 21 L de água destilada (ensaio de Inverno) e recolheu-se uma alíquota (1.5 mL), no fim de cada coluna, a cada litro de água destilada adicionada.

Por fim, fez-se a extração do DNA (**3.2 Extração de DNA**), presente em cada alíquota, e a sua quantificação, com recurso ao *7300 Real Time PCR System* (**3.8.3. PCR Tempo Real**), para determinar a concentração de MNT (UG/mL) recolhido a cada litro do ensaio.

NOTA: Os valores de água estéril adicionados foram determinados tendo em conta a área do topo da coluna utilizada e o valor da precipitação média por mm (1L por m²), em Portugal.

4. Tratamento de Resultados

4.1. Ensaio de crescimento de isolados a diferentes temperaturas

Comparou-se o crescimento de 24 isolados de MNT: NPS 003, NPS 006, NPS 007, NPS 008, NPS 013, NPS 023, NPS 048, NPS 081, NPS 091, NPS 115, NPS 116, NPS 129, NPS 213, NPS 287, 101B, 207B, NPS 127, 03077, DSMZ 44848, SMG, NPS 087, NPS 189, NPS 203, NPS 017, em MB e H₂O, a diferentes temperaturas – 8 °C, 20 °C, 37 °C, 44 °C e 60 °C. Os crescimentos foram determinados através de dois métodos diferentes: Crescimento em placa de MB (**Tabela 4.1** e **Tabela 4.2**) e determinação do conteúdo total de proteínas (µg/mL) (**Figura 4.1** a **Figura 4.8**).

4.1.1. Inoculação de isolados de MNT

Comparou-se o crescimento, em placa, de 21 isolados de MNT: NPS 003, NPS 006, NPS 007, NPS 008, NPS 013, NPS 023, NPS 048, NPS 081, NPS 091, NPS 115, NPS 116, NPS 129, NPS 287, 101B, 207B, NPS 127, 03077, DSMZ 44848, SMG, NPS 087, NPS 189, crescidos em MB ou H₂O, quando sujeitos a diferentes temperaturas: 8 °C, 20 °C, 37 °C, 44 °C e 60 °C, durante 20 dias de exposição ao stress térmico (**Tabela 4.1** e **Tabela 4.2**).

Resistência de espécies de *Mycobacterium* a diferentes condições de *stress* relacionadas com o tratamento de água

Tabela 4.1 - Crescimento dos 21 isolados selecionados, em MB, ao fim de 20 dias de incubação às diferentes temperaturas em estudo: 8 °C, 20 °C, 37 °C, 44 °C e 60 °C. Foi usado como controlo o crescimento, em MB, a 37 °C, durante o período de estudo. Representação: Crescimento: + (cor vermelha); Ausência de crescimento: – (cor preta); Contaminação do isolado: *.

Temperatura Isolado	8 °C	20 °C	37 °C	44 °C	60 °C
NPS 003	-	+	+	+	-
NPS 006	-	+	+	+	-
NPS 007	+	+	+	+	-
NPS 008	+	+	+	+	-
NPS 013	+	+	+	+	-
NPS 023	+	+	+	+	-
NPS 048	+	+	+	-	-
NPS 081	+	+	+	-	-
NPS 091	+	+	+	+	-
NPS 115	+	+	+	-	-
NPS 116	+	+	+	-	-
NPS 129	+	+	+	-	-
NPS 287	+	+	+	*	-
101B	+	+	+	*	-
207B	+	+	+	+	-
NPS 127	+	+	+	+	-
03077	+	+	+	*	-
DSMZ 44848	+	+	+	+	-
SMG	+	+	+	+	-
NPS 087	+	+	+	-	-
NPS 189	-	+	+	-	-

Resistência de espécies de *Mycobacterium* a diferentes condições de *stress* relacionadas com o tratamento de água

Tabela 4.2 - Crescimento dos 21 isolados selecionados, em H₂O, ao fim de 20 dias de incubação às diferentes temperaturas em estudo: 8 °C, 20 °C, 37 °C, 44 °C e 60 °C. Foi usado como controlo o crescimento em H₂O a 37 °C, durante o período de estudo. Representação: Crescimento: + (cor vermelha); Ausência de crescimento: – (cor preta); Contaminação do isolado: *.

Temperatura Isolado	8 °C	20 °C	37 °C	44 °C	60 °C
NPS 003	+	+	+	+	-
NPS 006	+	+	+	+	-
NPS 007	+	+	+	+	-
NPS 008	-	+	+	+	-
NPS 013	-	+	+	-	-
NPS 023	-	-	+	-	-
NPS 048	+	+	+	-	-
NPS 081	+	+	+	-	-
NPS 091	-	-	+	+	-
NPS 115	+	+	+	-	-
NPS 116	+	+	+	-	-
NPS 129	+	+	+	-	-
NPS 287	+	-	+	-	-
101B	-	+	+	-	-
207B	-	+	+	+	-
NPS 127	+	+	+	+	-
03077	-	+	+	+	-
DSMZ 44848	-	-	+	+	-
SMG	-	+	+	+	-
NPS 087	-	-	+	+	-
NPS 189	-	-	+	-	-

4.1.2. Quantificação da concentração total de proteínas (µg/mL) das células bacterianas

Comparou-se a concentração total de proteína (µg/mL) de 14 isolados de MNT: NPS 003, NPS 006, NPS 007, NPS 013, NPS 115, NPS 129, NPS 213, NPS 287, 101B, 207B, DSMZ 44848, SMG, NPS 203, NPS 017, crescidos em MB ou H₂O, quando sujeitos a diferentes temperaturas: 8 °C, 20 °C, 37 °C, 44 °C e 60 °C, durante 20 dias de exposição ao *stress* térmico (**Figura 4.1 a 4.8**).

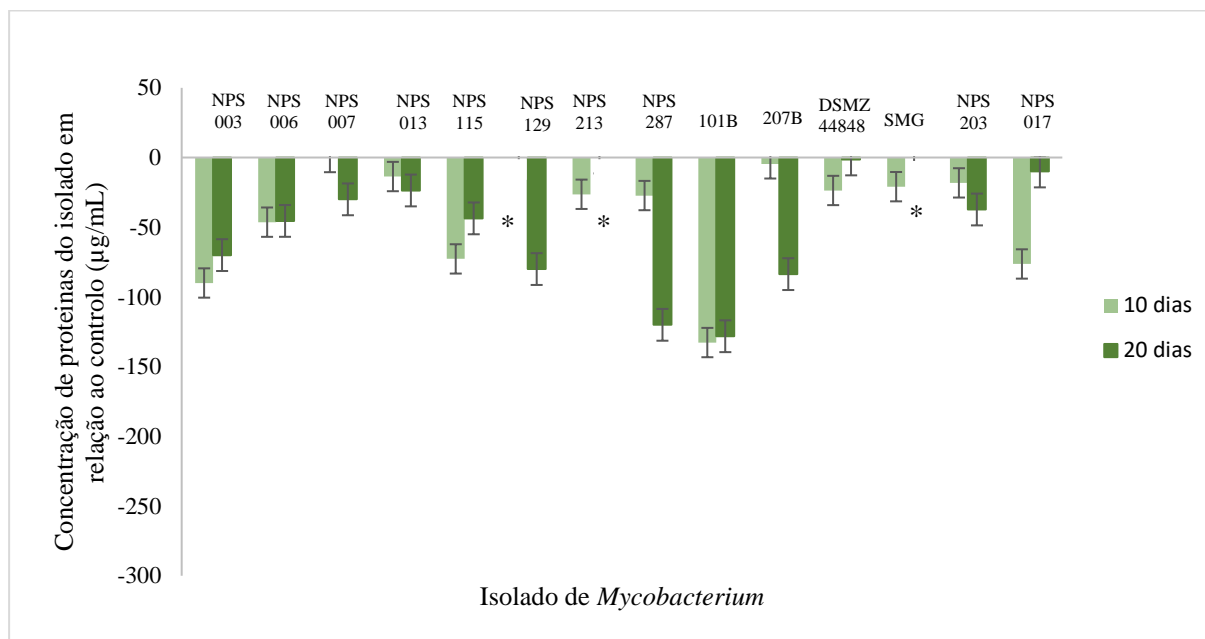


Figura 4.1 - Concentração total de proteínas (µg/mL), dos isolados NPS 003, NPS 006, NPS 007, NPS 013, NPS 115, NPS 129, NPS 213, NPS 287, 101B, 207B, DSMZ 44848, SMG, NPS 203 e NPS 017, crescidas em MB, em relação ao controle (crescimento a 37 °C), ao fim de 10 e 20 dias de incubação a 8 °C. (*) – Contaminação do isolado.

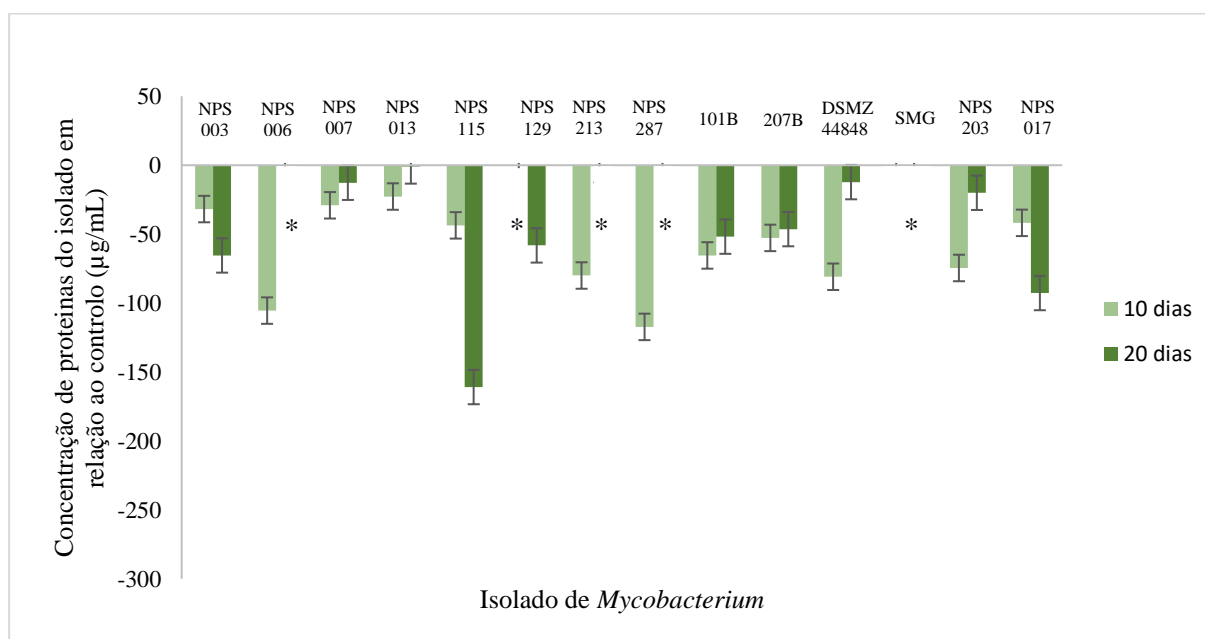


Figura 4.2 - Concentração total de proteínas (µg/mL), dos isolados NPS 003, NPS 006, NPS 007, NPS 013, NPS 115, NPS 129, NPS 213, NPS 287, 101B, 207B, DSMZ 44848, SMG, NPS 203, NPS 017, crescidas em MB, em relação ao controle (crescimento a 37 °C), ao fim de 10 e 20 dias de incubação a 20 °C. (*) – Contaminação do isolado.



Figura 4.3 - Concentração total de proteínas (µg/mL), dos isolados NPS 003, NPS 006, NPS 007, NPS 013, NPS 115, NPS 129, NPS 213, NPS 287, 101B, 207B, DSMZ 44848, SMG, NPS 203 e NPS 017, crescidas em MB, em relação ao controle (crescimento a 37 °C), ao fim de 10 e 20 dias de incubação a 44 °C. (*) – Contaminação do isolado.

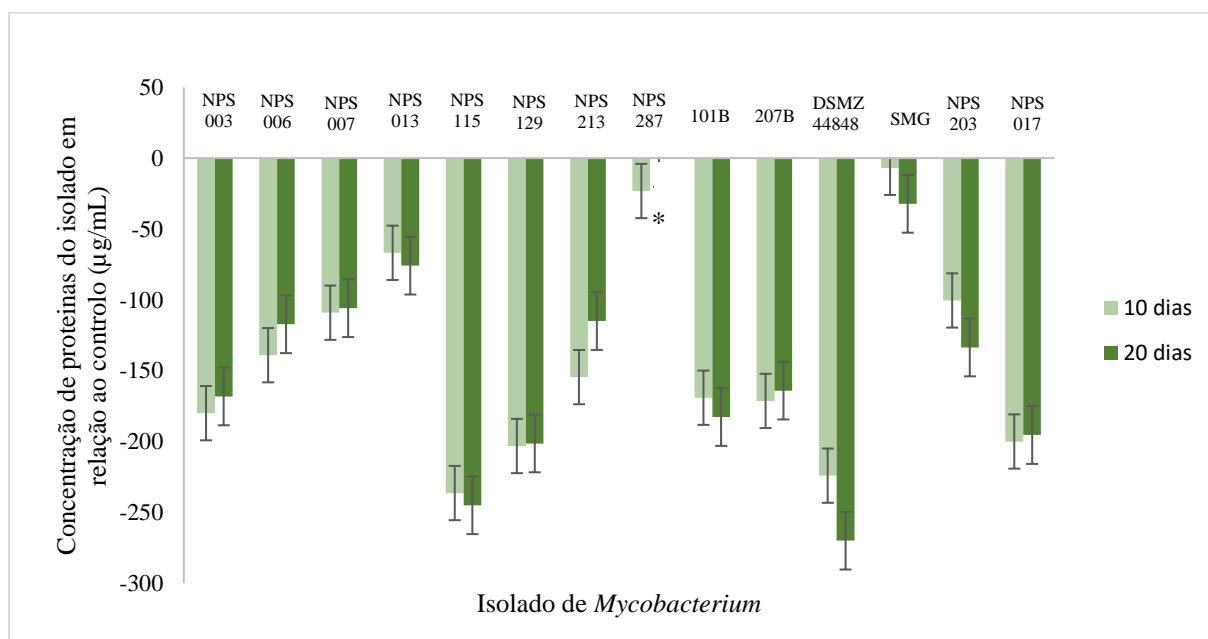


Figura 4.4 - Concentração total de proteínas (µg/mL), dos isolados NPS 003, NPS 006, NPS 007, NPS 013, NPS 115, NPS 129, NPS 213, NPS 287, 101B, 207B, DSMZ 44848, SMG, NPS 087, NPS 203 e NPS 017, crescidas em MB, em relação ao controle (crescimento a 37 °C), ao fim de 10 e 20 dias de incubação a 60 °C. (*) – Contaminação do isolado.

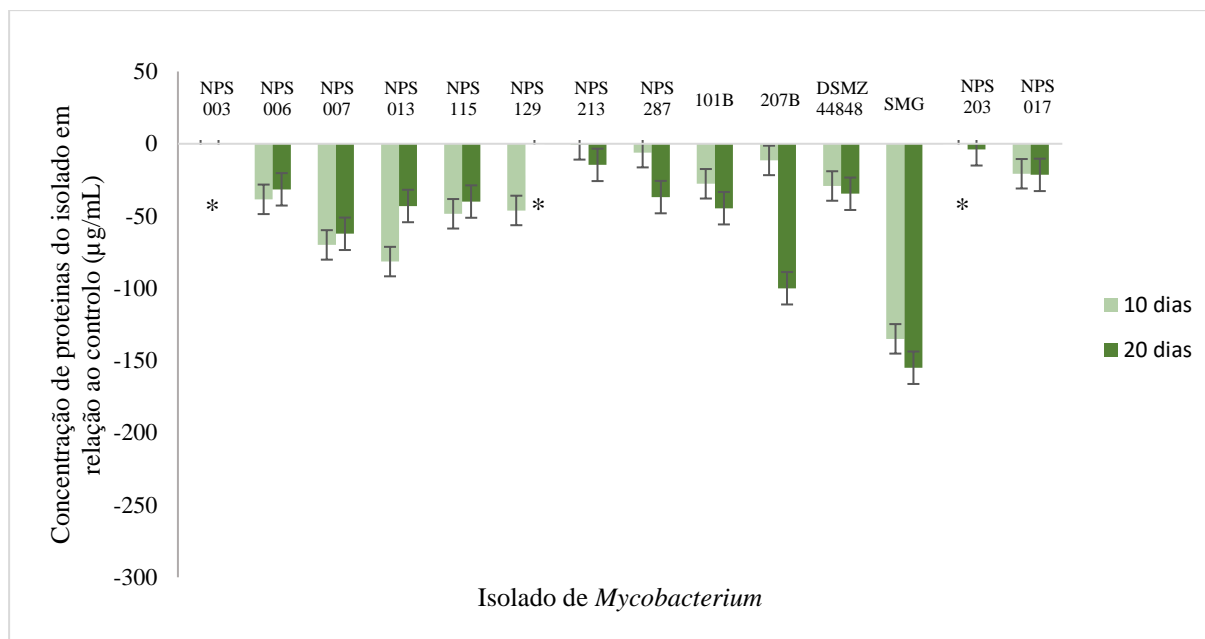


Figura 4.5 - Concentração total de proteínas (µg/mL), dos isolados NPS 003, NPS 006, NPS 007, NPS 013, NPS 115, NPS 129, NPS 213, NPS 287, 101B, 207B, DSMZ 44848, SMG, NPS 203 e NPS 017, crescidas em H₂O, em relação ao controlo (crescimento a 37 °C), ao fim de 10 e 20 dias de incubação a 8 °C. (*) – Contaminação do isolado.



Figura 4.6 - Concentração total de proteínas (µg/mL), dos isolados NPS 003, NPS 006, NPS 007, NPS 013, NPS 115, NPS 129, NPS 213, NPS 287, 101B, 207B, DSMZ 44848, SMG, NPS 203 e NPS 017, crescidas em H₂O, em relação ao controlo (crescimento a 37 °C), ao fim de 10 e 20 dias de incubação a 20 °C. (*) – Contaminação do isolado.



Figura 4.7 - Concentração total de proteínas (µg/mL), dos isolados NPS 003, NPS 006, NPS 007, NPS 013, NPS 115, NPS 129, NPS 213, NPS 287, 101B, 207B, DSMZ 44848, SMG, NPS 203 e NPS 017, crescidas em H₂O, em relação ao controle (crescimento a 37 °C), ao fim de 10 e 20 dias de incubação a 44 °C. (*) – Contaminação do isolado.

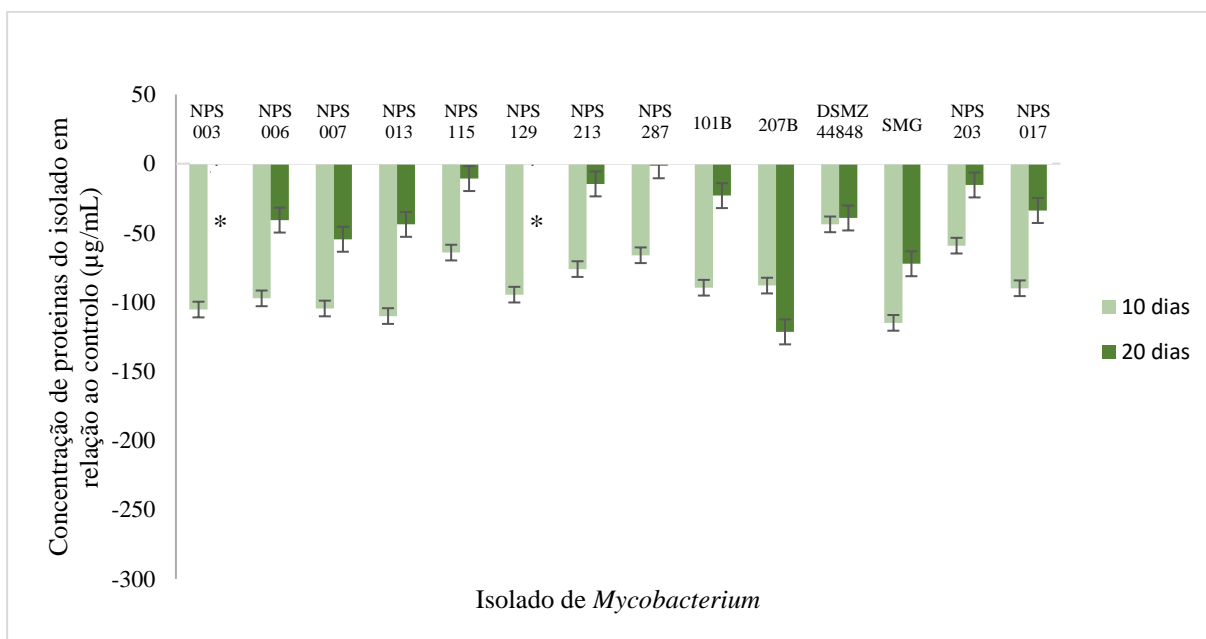


Figura 4.8 - Concentração total de proteínas (µg/mL), dos isolados NPS 003, NPS 006, NPS 007, NPS 013, NPS 115, NPS 129, NPS 213, NPS 287, 101B, 207B, DSMZ 44848, SMG, NPS 203 e NPS 017, crescidas em H₂O, em relação ao controle (crescimento a 37 °C), ao fim de 10 e 20 dias de incubação a 60 °C. (*) – Contaminação do isolado.

A temperatura é um importante fator no que respeita à adaptação ambiental microbiana. Os microrganismos não-termófilos tendem a ser mortos a elevadas temperaturas e a ficarem num estado dormente a baixas temperaturas (Santos, 2016) ao contrário do que acontece com os organismos termófilos, que são altamente especializados e têm a capacidade de resistir a elevadas temperaturas durante longos períodos de tempo, devido à sua especialização ambiental (Bergey, 1919).

Através das **Tabela 4.1** e **Tabela 4.2**, é possível observar que para as temperaturas de 8 °C e 20 °C, obteve-se crescimento para a grande maioria dos isolados. Os isolados de *Glacier National park* (NPS 115, NPS 116, NPS 129, NPS 127, NPS 189 e NPS 287) estão adaptados a ambientes com temperaturas médias reduzidas durante o ano inteiro (a temperatura variou entre -12.0 e 30.0 em 2016-2017) (U.S. Climate Data, 2017), bem como os isolados de *Yellowstone National Park* (NPS 003, NPS 006, NPS 007, NPS 008, NPS 013, NPS 023, NPS 048, NPS 081, NPS 087, NPS 091, NPS 213, 101B e 207B), que contactam com temperaturas reduzidas durante os Invernos rigorosos, em que a temperatura decresce para valores inferiores a -10 °C (U.S. Climate Data, 2017). Os outros isolados em estudo: 101B, 207B, 03077, DSMZ 44848 e SMG, apesar de não serem provenientes de ambientes extremos, também cresceram a valores de temperatura de 8 °C e 20 °C.

Para temperaturas superiores (44 °C), observa-se que os isolados de *Yellowstone National Park* e os isolados 101B, 207B, 03077, SMG e DSMZ 44848, estão mais adaptadas do que as de *Glacier National Park*. Isto justifica-se pelo facto de os isolados de *Yellowstone National Park* contactarem com temperaturas elevadas devidas às fontes termais, permitindo-lhes assim sobreviver à exposição a temperaturas elevadas, ao contrário dos isolados de *Glacier National Park* que contactam o ano inteiro com temperaturas reduzidas. As MNT 101B, 207B, 03077, SMG e DSMZ 44848 apresentam um comportamento semelhante aos dos isolados recolhidos em *Yellowstone National Park*, o que pode ser justificado pela sua proveniência ambiental.

Não se obteve crescimento em placa a 60 °C, o que indica que os isolados em estudo não têm a capacidade de multiplicar, pelo menos até se obter colónias visíveis, a este valor de temperatura.

As diferenças observadas entre os dois meios em estudo, água destilada e meio de cultura, são esperadas dado que quando crescidas em meio de cultura têm uma maior disponibilidade de nutrientes (meio de controlo) quando comparado com o crescimento em água destilada (existente nos sistemas de distribuição de água), o que propicia o crescimento.

Paralelamente, fez-se a quantificação da concentração total de proteínas (µg/mL) de determinados isolados após 10 e 20 dias de exposição aos diferentes stresses térmicos. Os resultados obtidos neste ensaio (**Figura 4.1** a **Figura 4.8**) permitem concluir que para as temperaturas testadas há uma diminuição da concentração total de proteínas (µg/mL) em relação ao ensaio de controlo (crescimento a 37 °C). Este resultado era esperado dado que a temperatura ótima de crescimento das micobactérias é aproximadamente 37 °C (Farrell & Rose, 1967).

Esta diminuição da concentração total de proteínas em relação ao controlo pode ser explicada por uma diminuição da atividade metabólica, aos valores de temperatura testados, em relação ao ensaio controlo. De uma forma geral, as bactérias (com exceção dos organismos termófilos estritos) baixam os níveis do seu metabolismo a temperaturas reduzidas ou elevadas, embora algumas consigam desenvolver-se (Farrell and Rose, 1967; Nedwell, 1999). Dado que se obteve crescimento para os valores de 8 °C, 22 °C e 44 °C, para a maioria dos isolados analisados, as diferenças de concentrações de proteína (µg/mL) podem ser explicadas, em parte, pela diminuição da atividade metabólica das MNT em estudo, a estes valores de temperatura. É de notar também que existem mecanismos de mecanismos de defesa mediados por proteínas, nomeadamente *heat shock proteins*, que são responsáveis, em parte, pelo aumento a

concentração total de proteína ($\mu\text{g/mL}$) presente nas células (Stewart *et al.*, 2002), o que permite explicar possivelmente o facto de alguns isolados de *Glaciar National Park*, para valores de 44 °C, não apresentarem crescimento mas apresentarem diferenças de concentração de proteína em relação ao controlo semelhantes aos isolados adaptados a esta temperatura (algumas MNT de *Yellowstone National Park*).

Para valores de temperatura de 60 °C, observa-se que há uma diminuição mais significativa da concentração de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) em relação ao controlo, o que acompanhado pela ausência de crescimento, indica que para além da diminuição da atividade metabólica há uma ausência de crescimento dos isolados, ocorrendo possivelmente a morte das MNT em estudo.

Através dos ensaios realizados de crescimento e quantificação da concentração total de proteínas às temperaturas em estudo, é possível observar que a janela de crescimento da maioria dos isolados analisados é de aproximadamente 40 °C. Em comparação com microrganismos extremófilos, nomeadamente, *Sulfolobus yangmingensis*, que cresce entre 65 °C-95 °C (Jan *et al.*, 1999), *Anaerobranca gottschalkii*, que cresce entre 30 °C-65 °C (Prowe & Antranikian, 2001) e *Thermococcus thioeducens*, que cresce entre 55 °C-94 °C (Pikuta *et al.*, 2007), é possível concluir que, tendo em conta os resultados obtidos, as micobactérias em estudo têm maiores janelas de temperatura do que estes organismos especializados (extremófilos). Isto pode ser explicado pela sua adaptação termal, conferindo-lhes assim uma vantagem face a desafios térmicos encontrados no meio ambiente. É de notar ainda que, os organismos extremófilos, por sua vez, apresentam janelas de temperatura maiores que os microrganismos mesófilos (Bergey, 1919; Heinen, 1971).

Nos sistemas de distribuição de água, a temperatura é provavelmente um dos fatores mais importantes que influencia, direta e indiretamente, o crescimento microbiano, afetando sensivelmente todas as propriedades físicas e químicas da água (EPA, 1992). Desta forma, tendo em conta a elevada capacidade de adaptação das MNT e a sua elevada janela de temperatura, a monitorização e seleção do valor de temperatura nestes sistemas é crucial quando se estabelecem as condições de desinfeção, de forma a garantir a sua eficácia. Para além da grande janela de temperaturas é preciso também ter em consideração a elevado período de tempo de resistência das micobactérias (neste estudo foram 20 dias de exposição ao stress térmico), que dificulta os tratamentos de desinfeção.

4.2. Ensaio de crescimento de isolados a diferentes pHs

Comparou-se o crescimento de 7 isolados: NPS 017, M.F. 22723, DSMZ 44848, SMG, 207B, NPS 203, NPS 129, em MB e H₂O, a diferentes valores de pH. Os crescimentos foram determinados através de dois métodos diferentes: Crescimento em placa de MB (**Tabela 4.3 e Tabela 4.4**) e determinação do conteúdo total de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) (**Figura 4.9 a Figura 4.15**).

4.2.1. Inoculação de isolados de MNT

Comparou-se o crescimento, em placa de MB, dos 7 isolados, crescidos em MB ou H₂O, quando expostos, durante 5 min e 1020 min, a diferentes valores de pH (Solução de HCl – pH entre 0-5; Solução de H₂SO₄ – pH entre 0-5 e Solução de NaOH – pH entre 7-14) (**Tabela 4.3 e Tabela 4.4**).

Resistência de espécies de *Mycobacterium* a diferentes condições de stress relacionadas com o tratamento de água

Tabela 4.3 - Crescimento dos isolados NPS 017, M.F. 22723, DSMZ 44848, SMG, 207B NPS 203 e NPS 129, em MB e H₂O, com 5 min de exposição às diferentes soluções com diferentes pHs em estudo (HCl: pH 0-5; H₂SO₄: pH 0-5 e NaOH: pH 7-14). Foi usado como controlo o crescimento em MB e H₂O com pH aproximadamente de 6 (sem adição de ácido ou base). Representação: Crescimento: + (cor vermelha); Ausência de crescimento: – (cor preta).

		Solução de pH																																							
		HCl												H ₂ SO ₄												NaOH															
		0		1		2		3		4		5		0		1		2		3		4		5		7		8		9		10		11		12		13		14	
		MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O		
NPS 017	NPS 017	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
M.F. 22723	M.F. 22723																																								
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
DSMZ 44848	DSMZ 44848																																								
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SMG	SMG	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
207B	207B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
NPS 203	NPS 203	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
NPS 129	NPS 129	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		

Resistência de espécies de *Mycobacterium* a diferentes condições de stress relacionadas com o tratamento de água

Tabela 4.4 - Crescimento dos isolados NPS 017, M.F. 22723, DSMZ 44848, SMG, 207B NPS 203 e NPS 129, em MB e H₂O, com 1020 min de exposição às diferentes soluções com diferentes pHs em estudo (HCl: pH 0-5; H₂SO₄: pH 0-5 e NaOH: pH 7-14). Foi usado como controlo o crescimento em MB e H₂O com pH aproximadamente de 6 (sem adição de ácido ou base). Representação: Crescimento: + (cor vermelha); Ausência de crescimento: – (cor preta).

		Solução de pH																																							
		HCl												H ₂ SO ₄												NaOH															
		0		1		2		3		4		5		0		1		2		3		4		5		7		8		9		10		11		12		13		14	
		MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O	MB	H ₂ O		
NPS 017	NPS 017	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
M.F. 22723	M.F. 22723	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
DSMZ 44848	DSMZ 44848	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
207B	207B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
NPS 203	NPS 203	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
NPS 129	NPS 129	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		

4.2.2. Quantificação da concentração total de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) de células bacterianas

Comparou-se a concentração total de proteína ($\mu\text{g/mL}$) dos 7 isolados em estudo, crescidos em MB ou H_2O , quando expostos, durante 1020 min, a diferentes valores de pH (Solução de HCl – pH entre 0-3; Solução de H_2SO_4 – pH entre 0-3 e Solução de NaOH – pH entre 11-13) (**Figura 4.9 a Figura 4.15**).

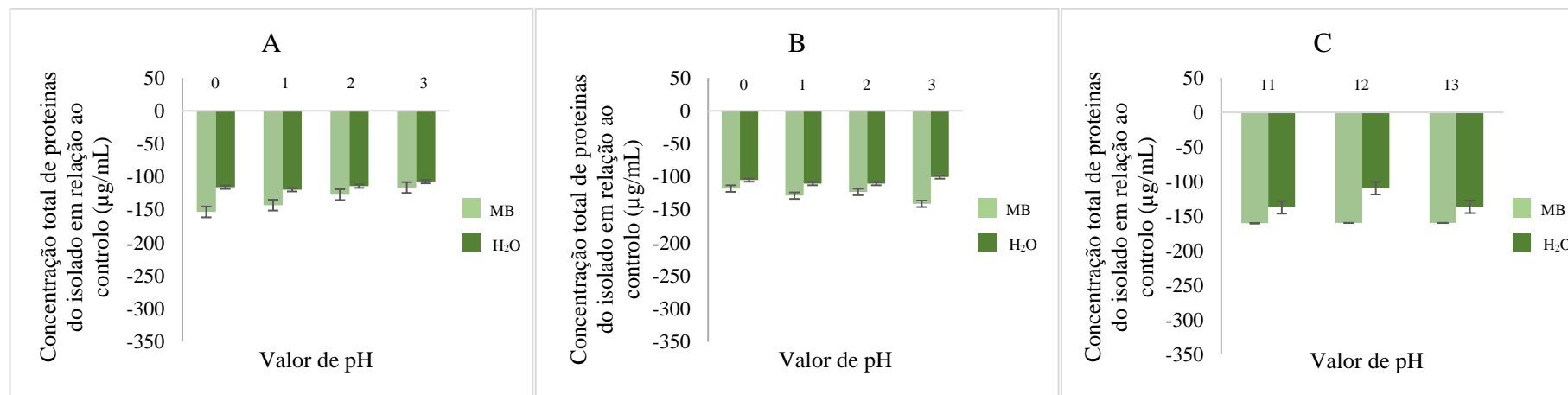


Figura 4.9 - Concentrações totais de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) de NPS 017, crescidas em MB ou H_2O , em relação ao controle (crescimento a pH 6), ao fim de 1020 min de exposição ao stress com: A) Ácido Clorídrico (HCl); B) Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) e C) Hidróxido de Sódio (NaOH).

Resistência de espécies de *Mycobacterium* a diferentes condições de stress relacionadas com o tratamento de água

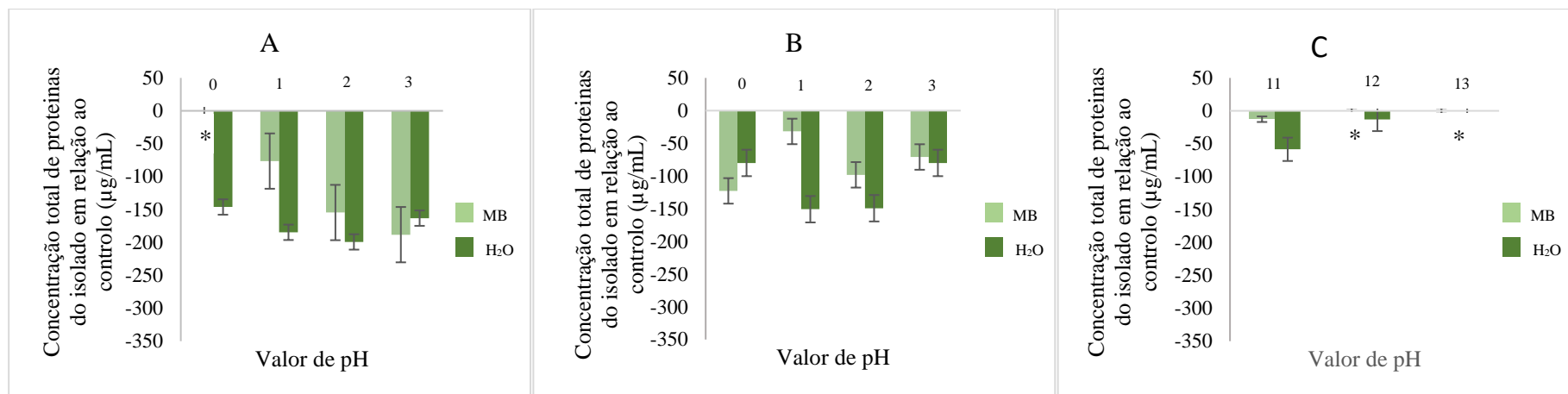


Figura 4.10 - Concentrações totais de proteínas (µg/mL) de M.F. 22723, crescidas em MB ou H₂O, em relação ao controle (crescimento a pH 6), ao fim de 1020 min de exposição ao stress com: A) Ácido Clorídrico (HCl); B) Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) e C) Hidróxido de Sódio (NaOH). (*) – Contaminação do isolado.

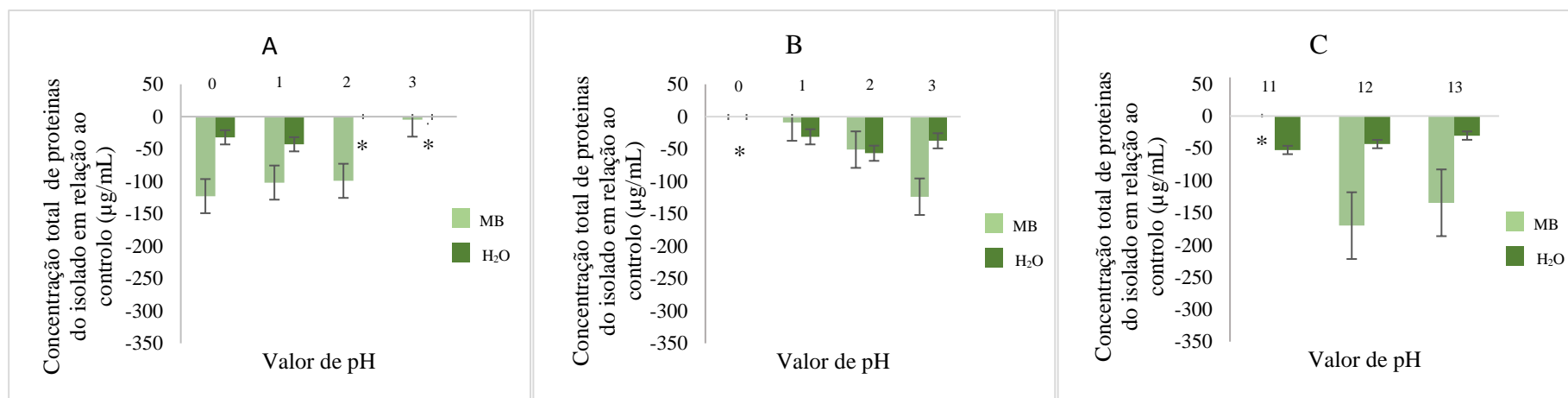


Figura 4.11 - Concentrações totais de proteínas (µg/mL) de DSMZ 44848, crescidas em MB ou H₂O, em relação ao controle (crescimento a pH 6), ao fim de 1020 min de exposição ao stress com: A) Ácido Clorídrico (HCl); B) Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) e C) Hidróxido de Sódio (NaOH). (*) – Contaminação do isolado.

Resistência de espécies de *Mycobacterium* a diferentes condições de stress relacionadas com o tratamento de água

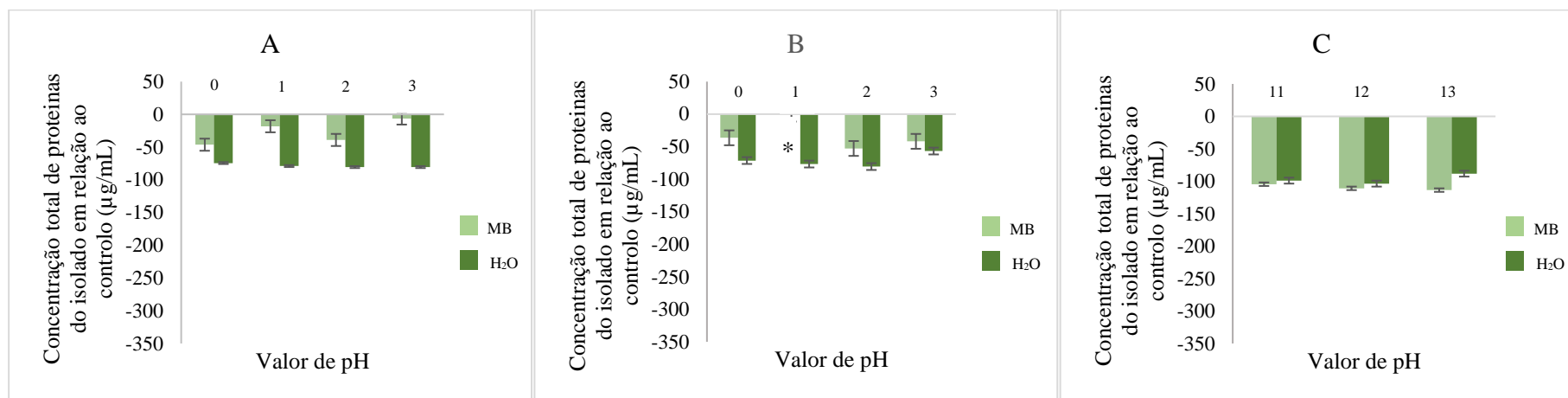


Figura 4.12 - Razão das concentrações totais de proteínas (μg/mL) do SMG, crescidas em MB ou H₂O, em relação ao controle (crescimento a pH 6) (μg/mL) (%), ao fim de 1020 min de exposição ao stress com: A) Ácido Clorídrico (HCl); B) Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) e C) Hidróxido de Sódio (NaOH). (*) – Contaminação do isolado.

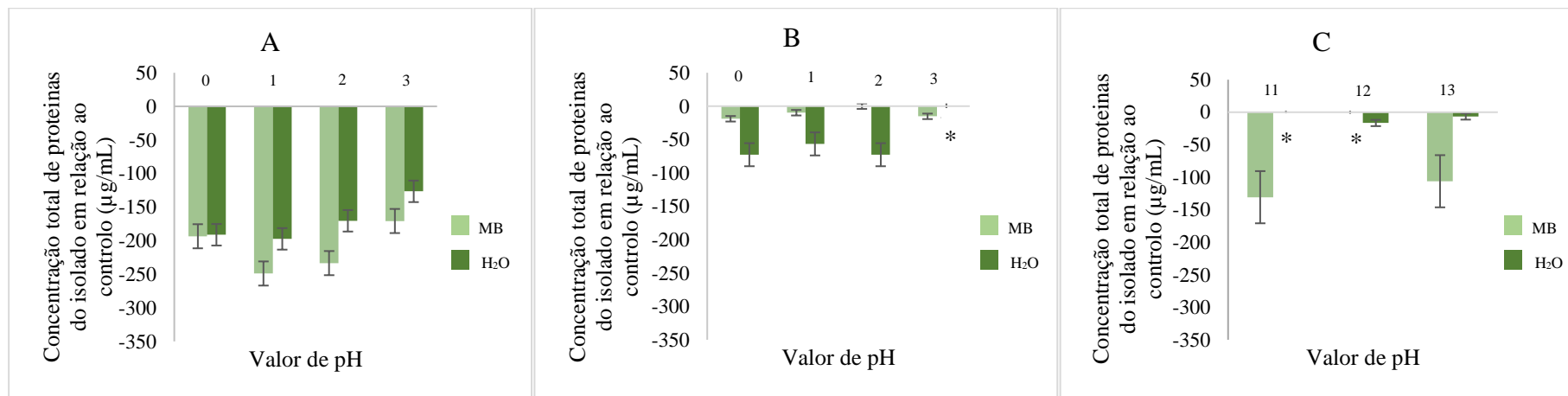


Figura 4.13 - Razão das concentrações totais de proteínas (μg/mL) de 207B, crescidas em MB ou H₂O, em relação ao controle (crescimento a pH 6) (μg/mL) (%), ao fim de 1020 min de exposição ao stress com: A) Ácido Clorídrico (HCl); B) Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) e C) Hidróxido de Sódio (NaOH). (*) – Contaminação do isolado.

Resistência de espécies de *Mycobacterium* a diferentes condições de stress relacionadas com o tratamento de água

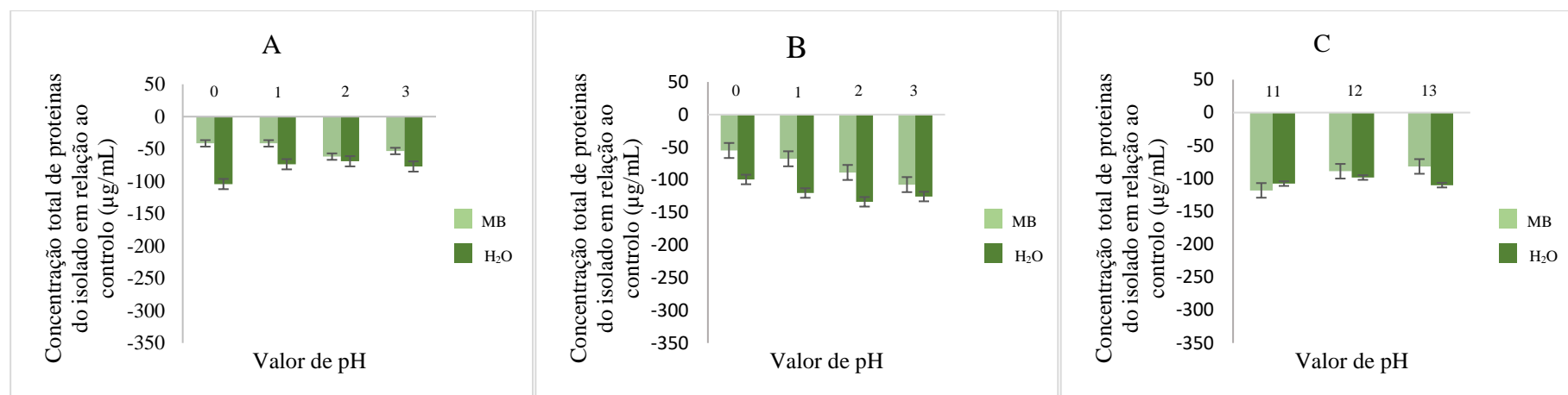


Figura 4.14 – Razão das concentrações totais de proteínas (µg/mL) de NPS 203, crescidas em MB ou H₂O, em relação ao controlo (crescimento a pH 6) (µg/mL) (%), ao fim de 1020 min de exposição ao stress com: A) Ácido Clorídrico (HCl); B) Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) e C) Hidróxido de Sódio (NaOH).

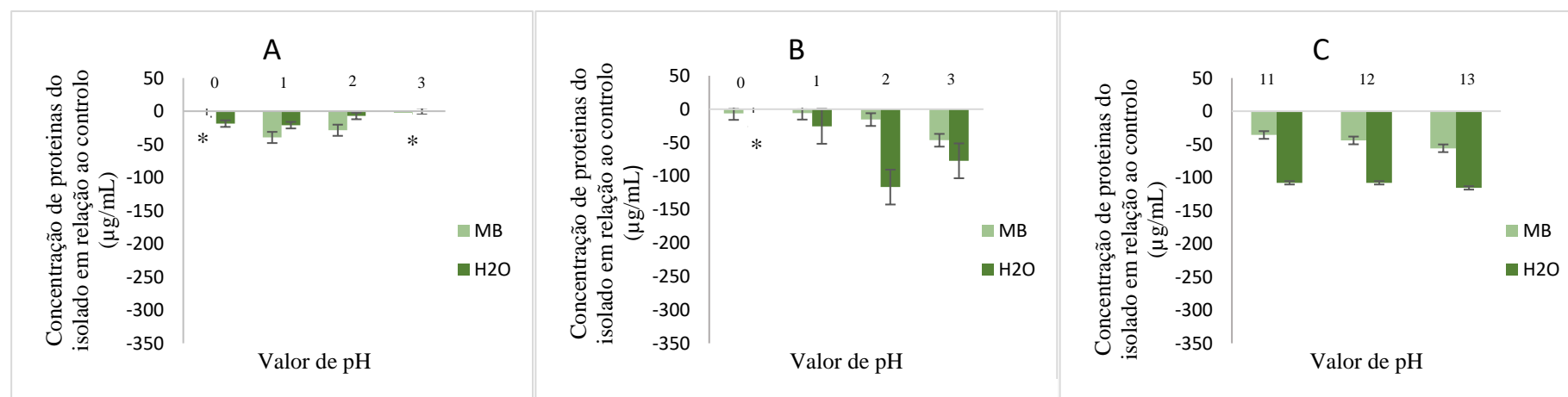


Figura 4.15 - Razão das concentrações totais de proteínas de NPS 129, crescidas em MB ou H₂O, em relação ao controlo (crescimento a pH 6) (µg/mL) (%), ao fim de 1020 min de exposição ao stress com: A) Ácido Clorídrico (HCl); B) Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) e C) Hidróxido de Sódio (NaOH). (*) – Contaminação do isolado.

A homeostasia ácido-base e a regulação do pH são críticas para a normal fisiologia e para o metabolismo e funções celulares (Hamm, Nakhoul & Hering-smith, 2015). Desta forma, os sistemas envolvidos na homeostasia do pH citosólico das células são fundamentais para a sobrevivência de todos os microrganismos (Vandal, Nathan & Ehrt, 2009). Aquando de alterações do pH extracelular, observa-se uma acidificação ou alcalinização do citoplasma em sentido oposto ao do pH exterior através da indução de respostas protetoras, com dois objetivos principais: manter a homeostasia do pH interno e preparar as células para sobreviver a futuras exposições a condições de pH mais extremos (valores de pH inferiores a 5 ou superiores a 9) (Castanie-Cornet *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2002; Vandal, Nathan & Ehrt, 2009). A maioria das bactérias não-extremófilas crescem em gamas de valores de pH externos entre 5.5-9.0, mantendo o pH citoplasmático entre 7.4-7.8 (Padan, Zilberstein & Rottenberg, 1976; Slonczewski *et al.*, 1981; Booth, 1985).

Através dos resultados obtidos anteriormente (**Tabela 4.3 e Tabela 4.4**), é possível verificar, mais uma vez, que o comportamento dos isolados em estudo depende da sua origem. Desta forma, tendo em conta os resultados obtidos para o crescimento, em placa, a diferentes valores de pH, observa-se que os isolados de *Yellowstone National Park* (NPS 017, NPS 203) são mais resistentes a valores de pH extremos do que os isolados de *Glacier National Park* (NPS 129), o que era esperado tendo em conta as condições ambientais observadas nos dois locais. Em relação aos isolados SMG, 207B, M.F. 22723 e DSMZ 44848 observa-se que as três primeiras apresentam crescimento a uma maior gama de pH do que DSMZ 44848, o que indica que estas têm uma maior capacidade de resistência aos valores de pH testados do que a estirpe clínica.

É de notar também, que em termos gerais os isolados são mais resistentes ao HCl do que ao H₂SO₄. Isto deve-se ao facto de o ácido sulfúrico, que apresenta dois hidrogénios, em meio aquoso perder rapidamente um dos seus hidrogénios (segundo a reação $H_2SO_4 \rightarrow H^+ + HSO_4^-$) dando origem a sulfato de hidrogénio, um ácido fraco (Margarella *et al.*, 2013). Dado que os ácidos orgânicos fracos, a um dado pH, estão parcialmente ionizados em solução aquosa enquanto os ácidos fortes estão completamente dissociados, apresentam valores de pKa superiores aos dos ácidos fortes. Estes ácidos fracos, que se encontram-se geralmente protonados e sem carga, a uma dada taxa e dependente da solubilidade da membrana à molécula, podem difundir-se livremente através da membrana plasmática e entrar nas células. A dissociação dos ácidos fracos no citoplasma leva à libertação de um protão e consequentemente a uma acidificação progressiva do citoplasma que inibe o crescimento microbiano (Pandey *et al.*, 2016), nomeadamente através da inibição da glicólise (Krebs, Wigginst & Stubbs, 1983), diminuição do transporte ativo (Kotyk, 1961; Freese, Sheu & Galliers, 1973; Macris, 1975; Stratford & Rose, 1986), entre outros. Como os ácidos fortes estão ionizados, e devido ao interior hidrófobo das membranas celulares, a taxa de difusão passiva através da membrana é impossibilitada, não se observando por isso uma inibição tão significativa do crescimento das células.

Paralelamente, fez-se a quantificação da concentração total de proteínas (µg/mL) dos 7 isolados em estudo após a 1020 min de exposição ao stress. Os resultados obtidos neste ensaio (**Figura 4.9 a Figura 4.15**) permitem concluir que para os valores de pH testados há uma diminuição da concentração total de proteínas (µg/mL) em relação ao ensaio de controlo (crescimento a pH 6). Este resultado era esperado dado que o valor de pH ótimo de crescimento das micobactérias é aproximadamente 6.5 (Plorde, 2004). Esta diminuição da concentração total de proteínas em relação ao controlo pode ser explicada, em parte, por uma redução da atividade metabólica, aos valores de pH testados, em relação ao ensaio controlo. De uma forma geral, as bactérias baixam os níveis do seu metabolismo a valores de pH reduzidos ou elevados, embora algumas consigam desenvolver-se (Graham & Lund, 1983; Plorde, 2004; Lund, Tramonti & Biase, 2014).

Dado que a maioria dos isolados em estudo apresentou crescimento para os valores de pH em estudo, as diferenças de concentrações de proteína ($\mu\text{g/mL}$) obtidas podem ser explicadas, possivelmente, pela diminuição da atividade metabólica dos isolados em estudo. É de notar também que existem mecanismos de mecanismos de defesa mediados por proteínas, nomeadamente sistemas de tolerância ao ácido ou através da síntese de bombas de transporte de prótons (Booth, 1985; Saviola, 2010, 2012), que são responsáveis, em parte, pelo aumento a concentração total de proteína ($\mu\text{g/mL}$) presente nas células, o que permite explicar possivelmente o facto de alguns isolados que não apresentam crescimento em placa para valores reduzidos de pH (0 e 1) apresentem uma diferença de concentração de proteínas em relação ao controlo pouco significativa, sendo exemplos do referido o isolado NPS 129 (*Glaciar National Park*) para valores de pH 0 e 1, com exposição a HCl e H₂SO₄ e o isolado 207B para valores de pH 0 e 1 com exposição a H₂SO₄.

Neste ensaio foi possível observar que, a maioria os isolados testados apresentam uma elevada sobrevivência a valores extremos de pH (pH 0-14). Esta gama de resistência é extremamente notável quando comparado com organismos extremófilos, nomeadamente *Sulfolobus yangmingensis*, que cresce entre pH 2.0-6.0 (Jan *et al.*, 1999), *Anaerobranca gottschalkii*, que cresce entre pH 6.0-10.5 (Prowe & Antranikian, 2001) e *Thermococcus thio-reducens*, que cresce entre pH 5.0-8.5 (Pikuta *et al.*, 2007).

Uma possível explicação para a resistência das micobactérias a pH ácidos deve-se à fisiologia característica da sua parede celular. Contudo, os mecanismos moleculares envolvidos ainda não são totalmente compreendidos, e vias adicionais envolvidas na resistência das micobactérias ainda permanecem por identificar (Vandal, Nathan & Ehrt, 2009).

Tal como a temperatura os valores de pH influenciam, direta e indiretamente, o crescimento microbiano. Nos sistemas de distribuição de água, o pH tem de ser o menor valor possível, dentro dos critérios de qualidade da água. Isto porque valores de pH reduzidos limitam o crescimento microbiano e evitam a corrosão dos materiais dos sistemas de distribuição de água (Ratnayaka, Brandt & Johnson, 2009). Contudo, é necessário ter em conta a elevada plasticidade e capacidade de resistência das micobactérias a valores de pH extremos, tal como se verificou anteriormente, que dificulta os processos de desinfeção.

4.3. Crescimento a diferentes concentrações de cloro

Comparou-se o crescimento de 5 isolados: NPS 017, SMG, 207B, M.F. 22723 e DSMZ 44848, em MB e H₂O, com diferentes tempos de exposição – 10 min, 30 min, 2 h e 3 h- a diferentes concentrações de cloro – 1,2,5,7 e 10 ppm-, durante 30 dias. O crescimento a 0 ppm de cloro foi usado como controlo de crescimento (**Tabela 4.5** e **Tabela 4.6**).

Tabela 4.5 - Crescimento dos isolados NPS 017, SMG, 207B, M.F.22723 e DSMZ 44848, em MB, com diferentes tempos de exposição – 10 min, 30 min, 2 h e 3 h- a diferentes concentrações de cloro – 1,2,5,7 e 10 ppm-, durante 30 dias. Foi usado como controlo o crescimento em MB dos isolados na ausência de adição de cloro (0 ppm de cloro). Representação: Crescimento: + (cor vermelha); Ausência de crescimento: – (cor preta).

Concentração de NaClO

Tempo	1 ppm				2 ppm				5 ppm				7 ppm				10 ppm			
	10 min	30 min	2 h	3 h	10 min	30 min	2 h	3 h	10 min	30 min	2 h	3 h	10 min	30 min	2 h	3 h	10 min	30 min	2 h	3 h
Isolado																				
NPS 017	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SMG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
207B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M.F. 22723	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
DSMZ 44848	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Resistência de espécies de *Mycobacterium* a diferentes condições de *stress* relacionadas com o tratamento de água

Tabela 4.6 - Crescimento dos isolados NPS 017, SMG, 207B, M.F.22723 e DSMZ 44848, em H₂O, com diferentes tempos de exposição – 10 min, 30 min, 2 h e 3 h- a diferentes concentrações de cloro – 1,2,5,7 e 10 ppm-, durante 30 dias. Foi usado como controlo o crescimento em H₂O dos isolados na ausência de adição de cloro. Representação: + (cor vermelha) e Ausência de crescimento: – (cor preta).

Concentração de NaClO

	1 ppm				2 ppm				5 ppm				7 ppm				10 ppm			
	10 min	30 min	2 h	3 h	10 min	30 min	2 h	3 h	10 min	30 min	2 h	3 h	10 min	30 min	2 h	3 h	10 min	30 min	2 h	3 h
Tempo																				
Isolado																				
NPS 017	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SMG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
207B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M.F. 22723	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
DSMZ 44848	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Há mais de um século que as águas de consumo são tratadas com cloro e/ou derivados de cloro, sendo a cloração o método de desinfecção mais comum (Shrivastava *et al.*, 2004). Apesar da elevada eficácia do uso de cloro e derivados de cloro nos processos de desinfecção das águas de consumo, vários autores têm demonstrado que algumas bactérias têm desenvolvido resistência a diferentes agentes utilizados no tratamento das águas de consumo, incluindo a cloração. Pyle *et al* (1994) isolaram estirpes de *Pseudomonas cepacia* (género actualmente designado por *Burkholderia cepacia*) que apresentam reduzida suscetibilidade à cloração (Pyle, Watters & Mcfeters, 1994) e em 2001, Stewart *et al*, demonstraram que *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* em biofilmes são altamente resistentes a hipoclorito alcalino (Stewart *et al.*, 2001).

Os resultados obtidos neste trabalho experimental (**Tabela 4.5 e 4.6**) mostram que os isolados SMG e M.F. 22723 apresentam maior resistência, às concentrações de cloro em estudo, do que os restantes isolados estudados. Isto pode ser explicado pelo facto de estes isolados terem sido isoladas de locais onde o cloro está presente, o que permite explicar a sua adaptação e consequentemente a sobrevivência às diferentes concentrações de cloro utilizadas. Este resultado é concordante com os obtidos por Ridgway e Olson, que compararam as sensibilidades relativas ao cloro de bactérias isoladas de sistemas de distribuição de águas de consumo sujeitas a cloração e não sujeitas a este processo de tratamento. Estes autores observaram que as bactérias isoladas dos sistemas clorinados são mais resistentes, tanto ao cloro livre como às formas de cloro combinado, do que as bactérias isoladas a partir de sistemas de distribuição não clorinados. Isto sugere que existe uma seleção dos microrganismos mais tolerantes ao cloro nas águas sujeitas a tratamento com cloro (Ridgway & Olson, 1982).

Através dos resultados obtidos é também possível observar que o crescimento em baixas concentrações de nutrientes (crescimento em água destilada) aumenta a resistência à desinfecção (nomeadamente ao tratamento com cloro), observando-se que quando crescidas em águas os isolados de SMG e M.F. 22723 crescem até concentrações de 10 ppm (3 h e 2 h de exposição, respetivamente) ao invés do que acontece quando crescidas em MB, no qual o crescimento se faz até uma concentração de 7 ppm de cloro (com 3 h de exposição).

O efeito da concentração de nutrientes na resistência à desinfecção ainda não é totalmente compreendido, mas já foi reportado em vários organismos, especialmente *Legionella pneumophila* (Kuchta *et al.*, 1985) e *Klebsiella pneumoniae* (Stewart & Olson, 1992). Semelhantemente, Le Dantec *et al* 2002, reportou que *Mycobacterium gordonae*, uma MBT isolada de um sistema de distribuição de água é mais resistente ao cloro em meio com baixa concentração de nutrientes (Le Dantec *et al.*, 2002). Tayler *et al.* mostrou que *Mycobacterium avium* crescidas em água são 10 vezes mais resistentes que as células crescidas em meio de cultura (Taylor, Flakinhm III & Norton, 2000). Em ambientes com baixa concentrações de nutrientes, os organismos podem sofrer pressão seletiva para modificar as suas características fisiológicas de forma a maximizarem a aquisição de nutrientes (Stewart & Olson, 1992).

Desta forma, uma possível explicação para as diferentes resistências observadas nas diferentes espécies de micobactérias pode estar relacionada com a composição da parede celular, especialmente da camada externa, que varia de espécie para espécie de acordo com as condições de crescimento. Limitação ou depleção de nutrientes afeta as propriedades da superfície da célula e as funções da membrana, como a força protomotriz (Brown, Collier & Gilbert, 1990), que pode estar envolvida nos mecanismos de resistência.

Alterações no conteúdo e composição dos lípidos, lipopolissacáridos, porinas e catiões na membrana citoplasmática e externa podem estar relacionados com os fenómenos de resistência. Contudo, são necessários mais estudos para identificar os mecanismos moleculares envolvidos na resistência ao cloro. (Stewart & Olson, 1992).

Este estudo evidencia que algumas bactérias não são eliminadas aquando dos processos de desinfecção habitualmente utilizados. Desta forma, processos alternativos poderão ser equacionados para eliminar essas mesmas bactérias nos referidos sistemas de distribuição.

Como a resistência das MNT ao cloro é específico de espécies, é difícil estabelecer concentrações de cloro *standart* e intervalos de tempo para reduzir ou eliminar as micobactérias presentes nos sistemas de distribuição de cloro. Desta forma, é importante considerar o nível de resistência ao cloro das espécies de micobactérias responsáveis pela contaminação quando se estabelecem as condições de desinfecção (Le Dantec *et al.*, 2002).

4.4. Crescimento em condições de privação de nutrientes

Nos ambientes terrestres, aquáticos e do próprio hospedeiro, as bactérias enfrentam constantemente privação/carência de nutrientes, passando desta forma, a maioria do seu ciclo de vida em estados de repouso de não-crescimento (Wu, Gengenbacher and Dick, 2016). As micobactérias, nos sistemas de distribuição de água são sujeitos a condições adversas, nomeadamente a privação de nutrientes, dado que nestes sistemas as águas são sujeitas a tratamentos de remoção do carbono orgânico assimilável (Vaerewijck *et al.*, 2005).

4.4.1. Forma das células – Microscopia

Para estudar se em resposta à privação de nutrientes há alterações na morfologia das células das MNT em estudo, monitorizou-se, ao longo de 4 meses, a forma dos isolados: NPS 203, NPS 129, 207B, SMG, DSMZ 44848, M.F. 22723 e NPS 017. São apenas apresentadas as representações microscópicas, com amplificação total de 400x, os isolados DSMZ 448948, M.F. 22723 e NPS 017, ao fim de 0 e 4 meses de exposição ao *stress* em estudo (privação de nutrientes) (**Figura 4.16 a Figura 4.21**).

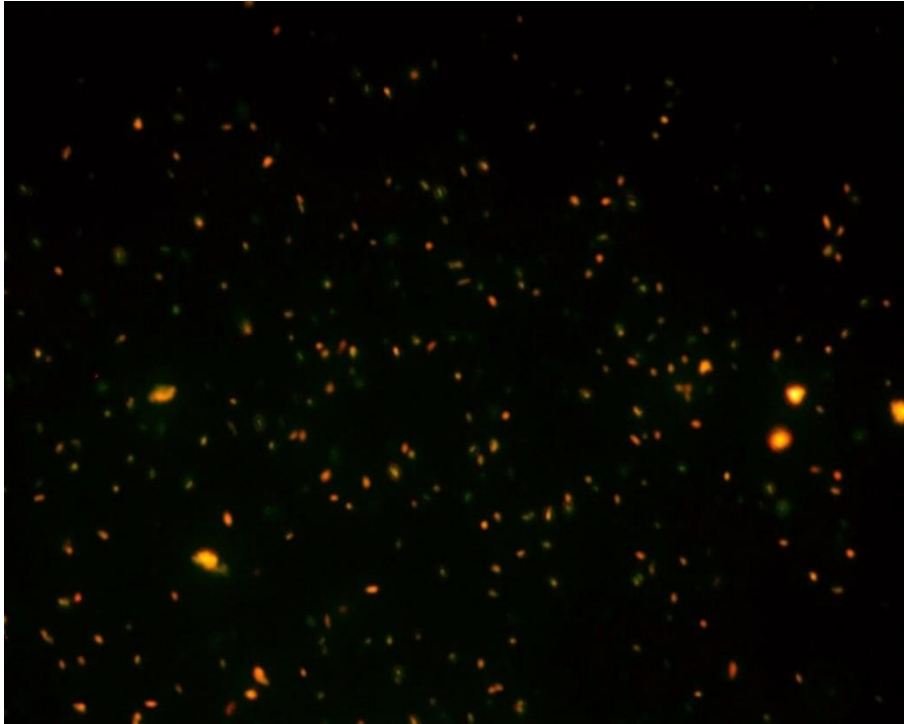


Figura 4.16 – Representação microscópica do isolado DSMZ 448948 após a suspensão em água destilada (0 dias de privação de nutrientes). As células de *Mycobacterium* são álcool-ácido resistentes por isso apresentam-se como bacilos amarelo-laranja, em fundo preto (após coloração Auramina-Rodamina). A imagem foi obtida com amplificação total de 400x.

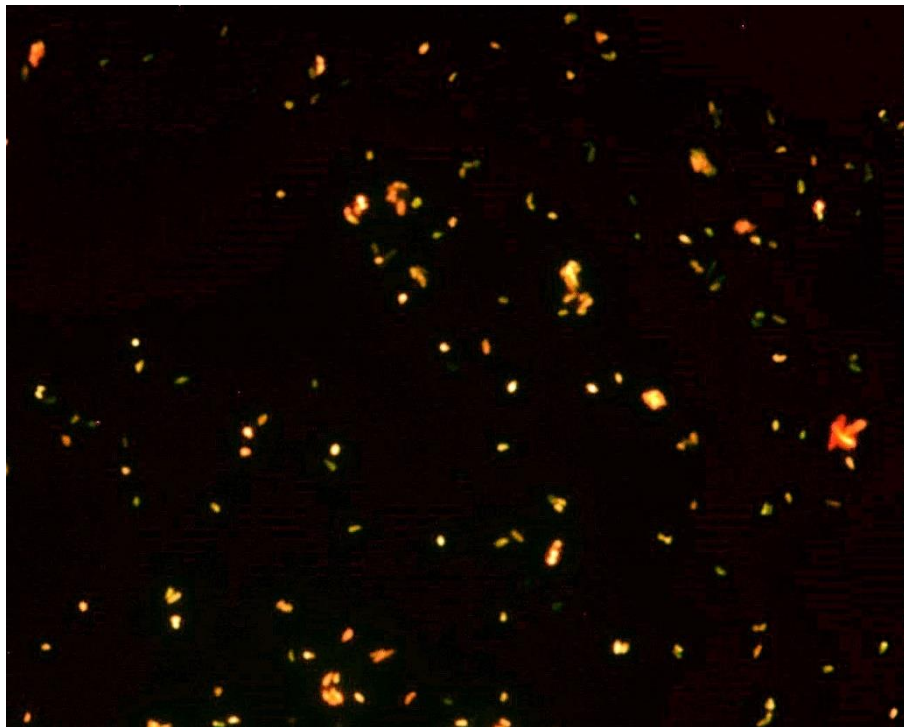


Figura 4.17 - Representação microscópica do isolado DSMZ 448948 após 4 meses de crescimento em água destilada (4 meses de privação de nutrientes). As células de *Mycobacterium* são álcool-ácido resistentes por isso apresentam-se como bacilos amarelo-laranja, em fundo preto (após coloração Auramina-Rodamina). A imagem foi obtida com amplificação total de 400x.

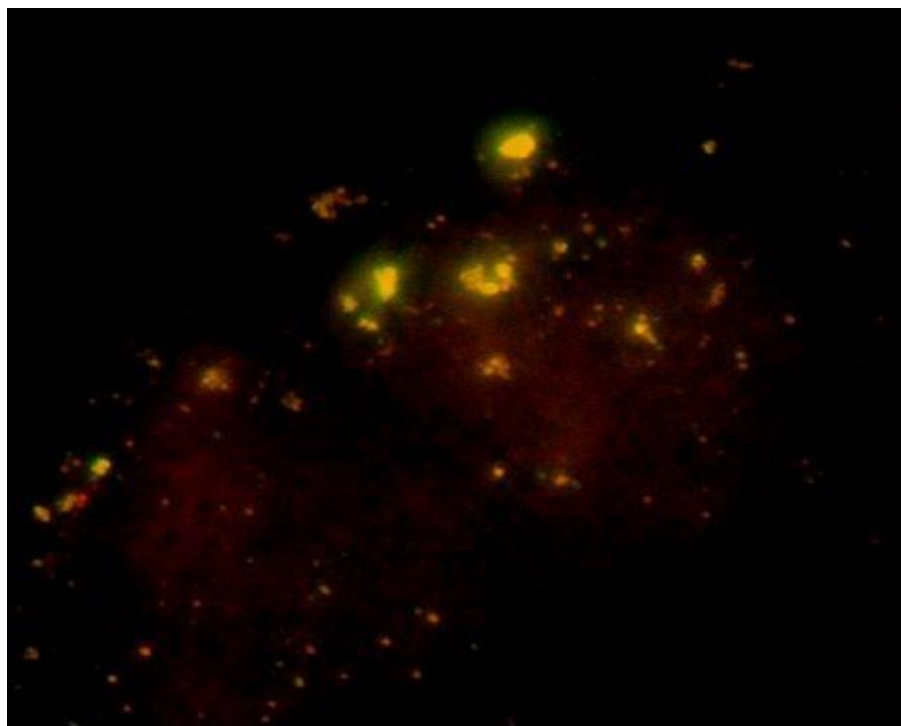


Figura 4.18 - Representação microscópica do isolado NPS 017 após a suspensão em água destilada (0 dias de privação de nutrientes). As células de *Mycobacterium* são álcool-ácido resistentes por isso apresentam-se como bacilos amarelo-laranja, em fundo preto (após coloração Auramina-Rodamina). A imagem foi obtida com amplificação total de 400x.

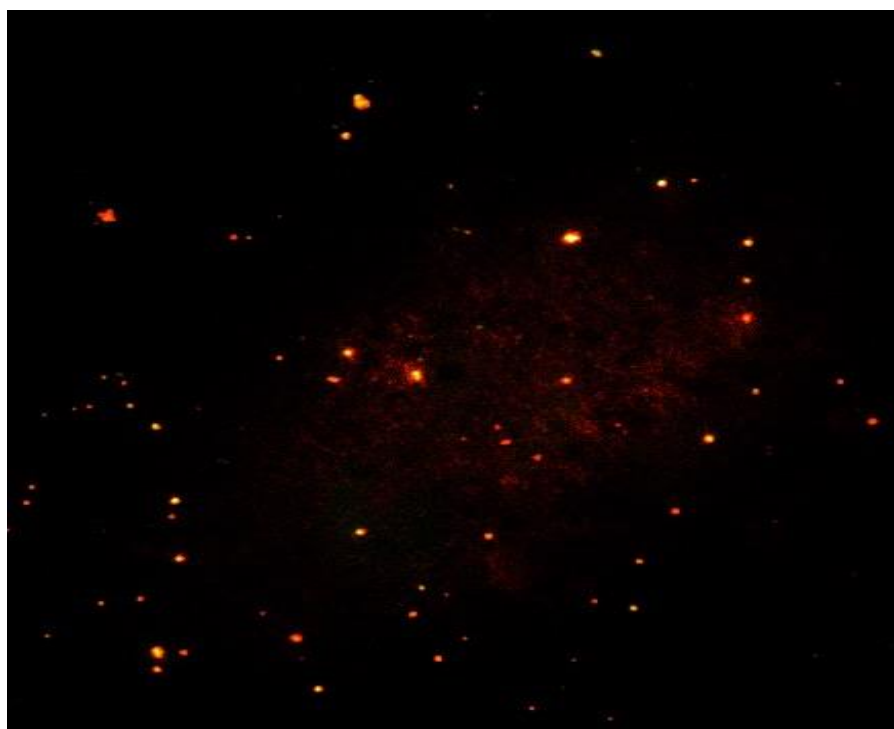


Figura 4.19 - Representação microscópica do isolado NPS 017 após 4 meses de crescimento em água destilada (4 meses de privação de nutrientes). As células de *Mycobacterium* são álcool-ácido resistentes por isso apresentam-se como bacilos amarelo-laranja, em fundo preto (após coloração Auramina-Rodamina). A imagem foi obtida com amplificação total de 400x.

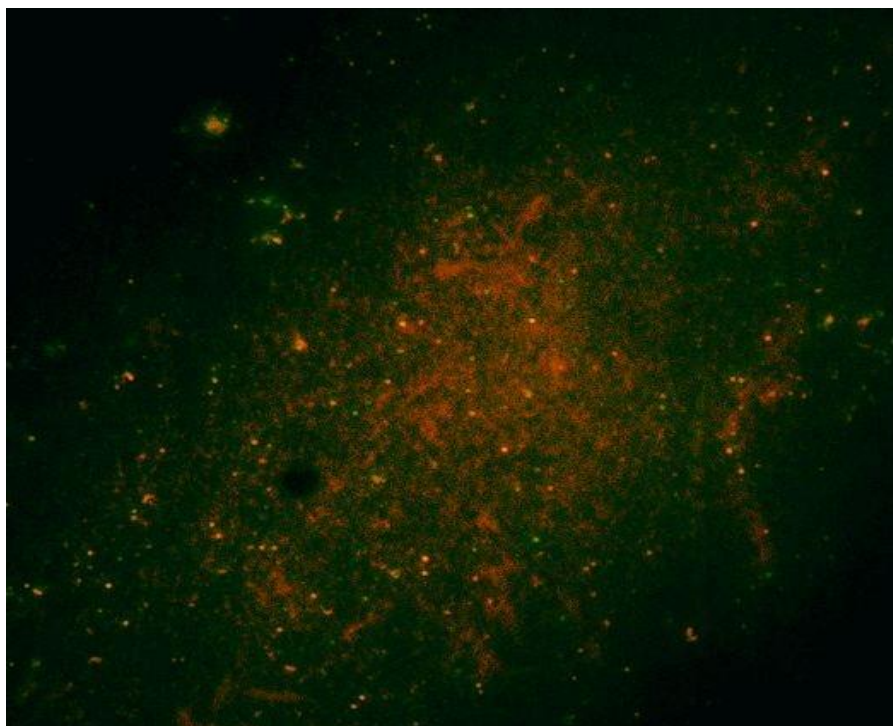


Figura 4.20 - Representação microscópica do isolado M.F. 22723 após a suspensão em água destilada (0 dias de privação de nutrientes). As células de *Mycobacterium* são álcool-ácido resistentes por isso apresentam-se como bacilos amarelo-laranja, em fundo preto (após coloração Auramina-Rodamina). A imagem foi obtida com recurso à objetiva 40x.

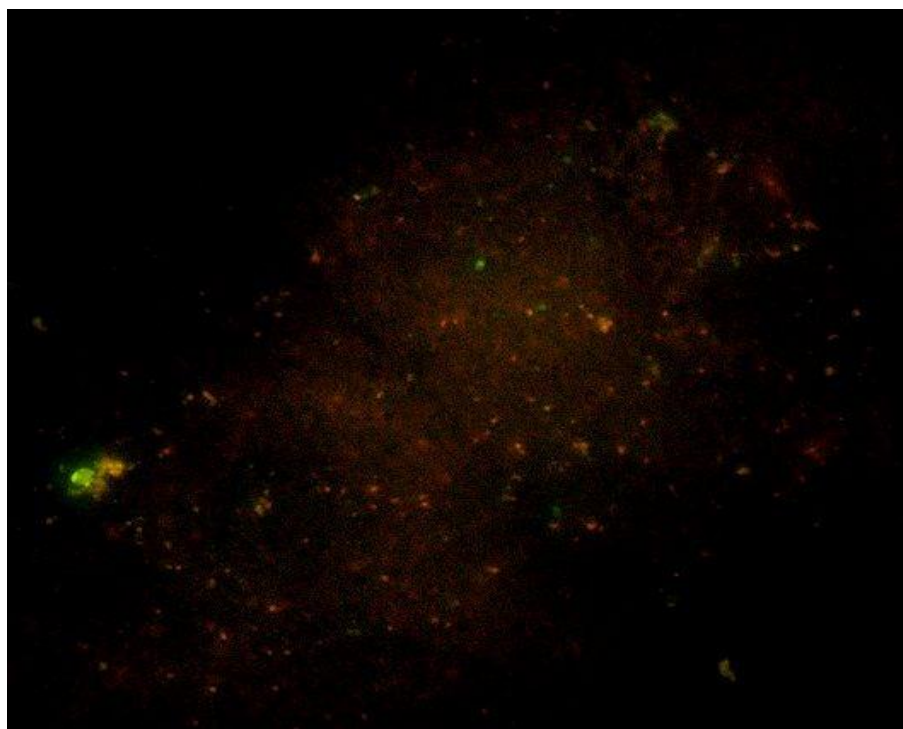


Figura 4.21 - Representação microscópica do isolado M.F. 22723 após 4 meses de crescimento em água destilada (4 meses de privação de nutrientes). As células de *Mycobacterium* são álcool-ácido resistentes por isso apresentam-se como bacilos amarelo-laranja, em fundo preto (após coloração Auramina-Rodamina). A imagem foi obtida com amplificação total de 400x.

Sob condições ambientais adversas, as bactérias desenvolvem diversas respostas de sobrevivência que envolvem adaptações fisiológicas ou alterações morfológicas distintas acompanhadas por adaptações fisiológicas. A adaptação morfológica mais notória observada em algumas bactérias, nomeadamente *Bacillus subtilis*, é a diferenciação destas bactérias em estruturas altamente resistentes – esporos, através de processo designado de esporulação. Noutros casos, nomeadamente em muitas bactérias Gram -, ao invés da formação de esporos observa-se o desenvolvimento de células resistentes sem dormência. Em ambos os casos, se os nutrientes se tornam disponíveis no meio outra vez, as células retomam o seu crescimento até uma nova exaustão dos nutrientes, entrando novamente em fase estacionária (Llorens, Tormo and Martínes-García, 2010; Wu, Gengenbacher and Dick, 2016).

A resposta à privação de nutrientes, que não envolve a formação de esporos, em bactérias Gram -, como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Vibrio* spp têm sido bem caracterizadas (Kolter, Ie & Torma, 1993; Foster & Spector, 1995). Uma das respostas observadas em *Escherichia coli*, *Vibrio* spp. e *Staphylococcus aureus* aquando de privação de nutrientes, de longo-termo, são as alterações morfológicas, observando-se uma diminuição do tamanho das células (Kjelleberg *et al.*, 1993; Lange & Hengge-Aronis, 1991; Watson, Clements & Foster, 1998).

Por outro lado, através da monitorização da forma das células ao longo dos quatro meses de privação de nutrientes, não se observou alterações significativas na morfologia das células dos isolados em estudo. Isto permite concluir que as micobactérias são capazes de resistir a este tipo de *stress* mantendo-se num estado não replicativo sem diferenciações morfológicas aparentes, nos primeiros meses. Desta forma, apesar de as MNT, não terem a capacidade de produzir esporos, são capazes de reter a sua viabilidade aquando da presença de condições adversas, nomeadamente a privação de nutrientes. Estes resultados são concordantes com estudos feitos por Sarathy *et al.* com *Mycobacterium tuberculosis* (Sarathy *et al.*, 2013).

4.4.2. Produção de ATP

Para verificar se em resposta à privação de nutrientes há alterações na concentração de ATP intracelular (p/mL) das MNT em estudo, monitorizou-se, ao longo de 4 meses, a concentração total de ATP de 7 isolados de MNT: NPS 203, NPS 129, 207B, SMG, DSMZ 44848, M.F. 22723 e NPS 017 (**Figura 4.22**).

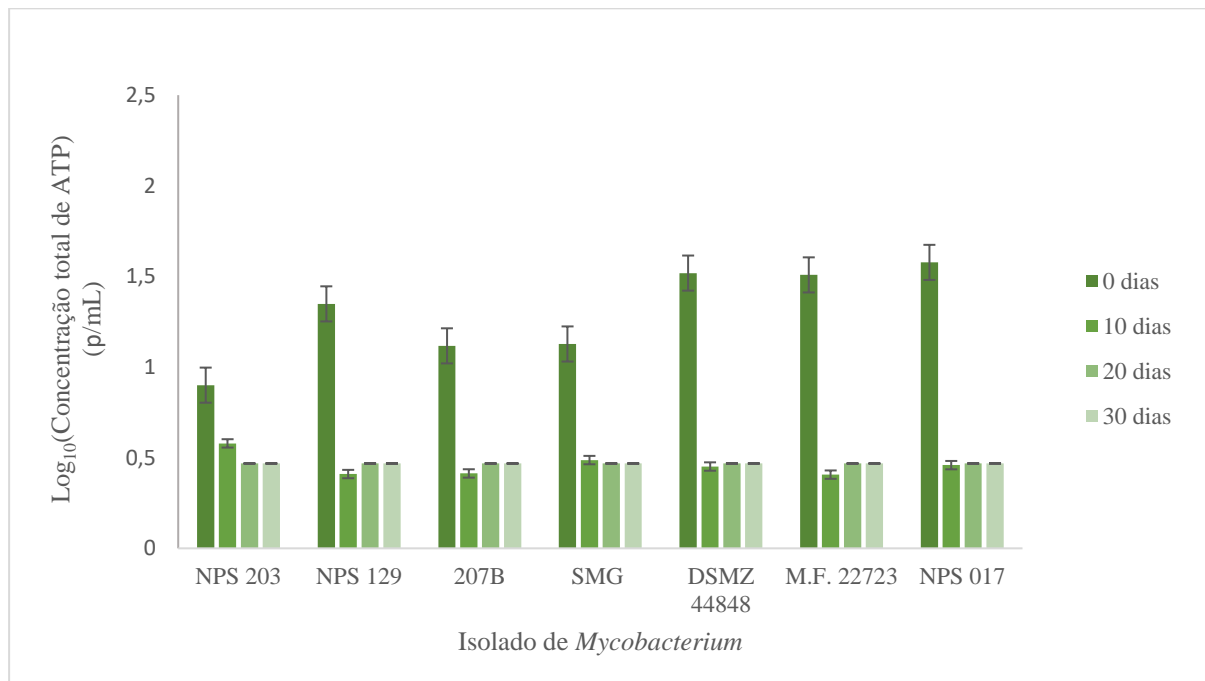


Figura 4.22 - Monitorização da concentração total de ATP (em p/mL) das isolados NPS 203, NPS 129, 207B, SMG, DSMZ 44848, M.F. 22723 e NPS 017 ao longo de 30 dias em condições de privação de nutrientes (crescimento em água destilada).

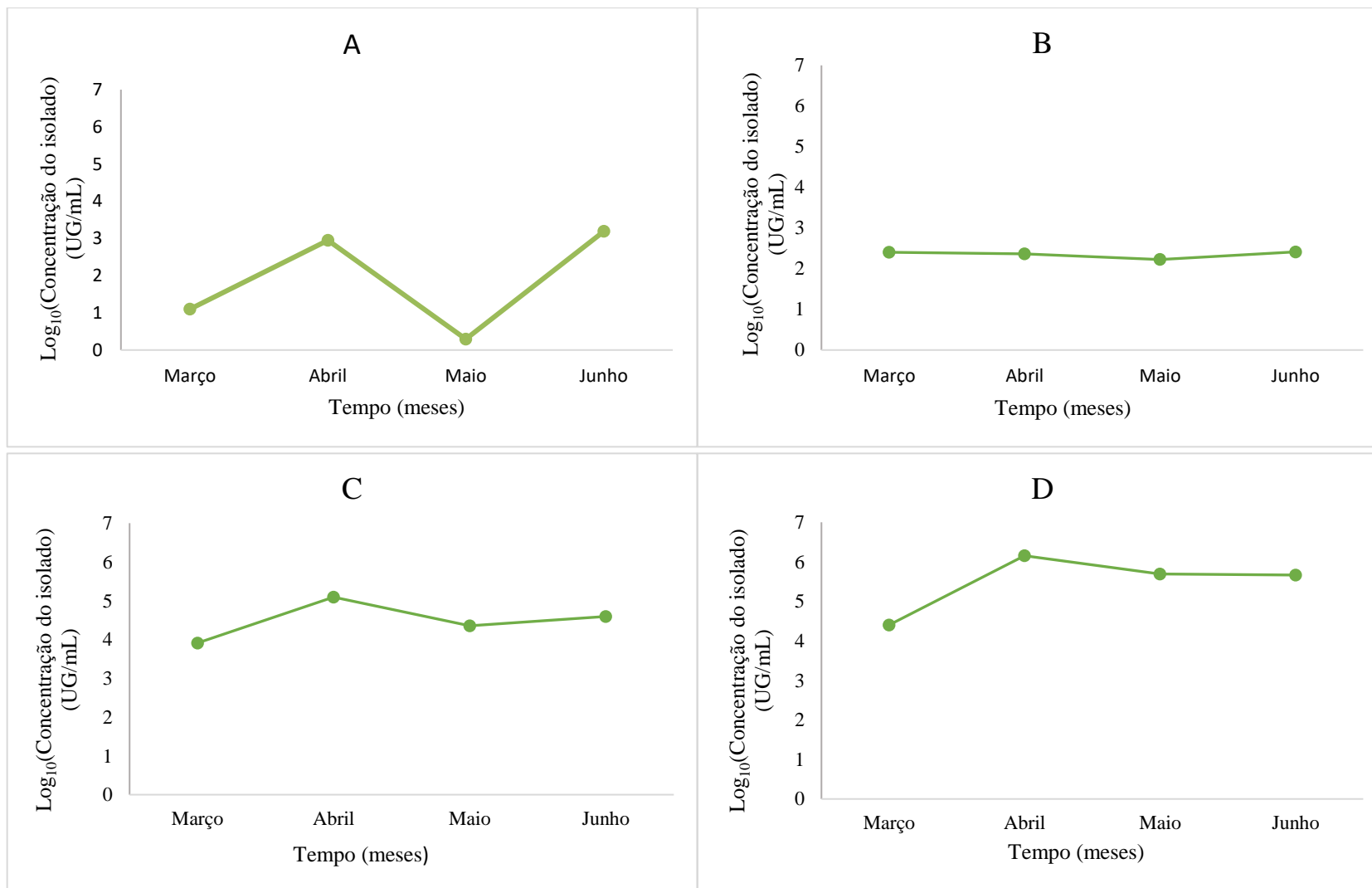
Tal como demonstrado em estudos recentes, através da monitorização realizada no trabalho experimental observou-se que em condições de reduzida quantidade de nutrientes (crescimento em água destilada), as micobactérias entram num estado estacionário, que é acompanhado pela diminuição da quantidade de ATP intracelular em, aproximadamente, 5 vezes. Esta resposta perante o crescimento em reduzidas concentrações de nutrientes, também foi observada por outros autores (Gengenbacher *et al.*, 2010; Wu, Gengenbacher and Dick, 2016) sugerindo que este é um mecanismo metabólico comum para sobrevivência das (mico)bactérias (num estado de não-crescimento) (Gengenbacher *et al.*, 2010; Wu, Gengenbacher & Dick, 2016). Esta redução da quantidade de ATP intracelular, em condições de privação de nutrientes, também foi observada noutros microrganismos, nomeadamente em *Staphylococcus aureus* (Onyango and Alreshidi, 2018).

Desta forma, o ATP para além de ser um substrato e um regulador de muitos processos metabólicos, funciona também como um regulador global do crescimento e/ou manutenção da viabilidade das bactérias em estado de não crescimento através do controlo da sua atividade metabólica global dos bacilos (Falkinham III, Norton & Mark, 2001).

4.4.3. Monitorização da concentração total de bactérias (UG/mL)

De forma a perceber se há alterações na concentração total das micobactérias (UG/mL) em estudo aquando da privação de nutrientes, monitorizou-se, ao longo de 4 meses em condições de baixa concentração de nutrientes, a concentração das MNT em estudo: NPS 017, M.F. 22723, DSMZ 44848, SMG, 207B, NPS 203 e NPS 129 (**Figura 4.23**).

Resistência de espécies de *Mycobacterium* a diferentes condições de *stress* relacionadas com o tratamento de água



Resistência de espécies de *Mycobacterium* a diferentes condições de *stress* relacionadas com o tratamento de água

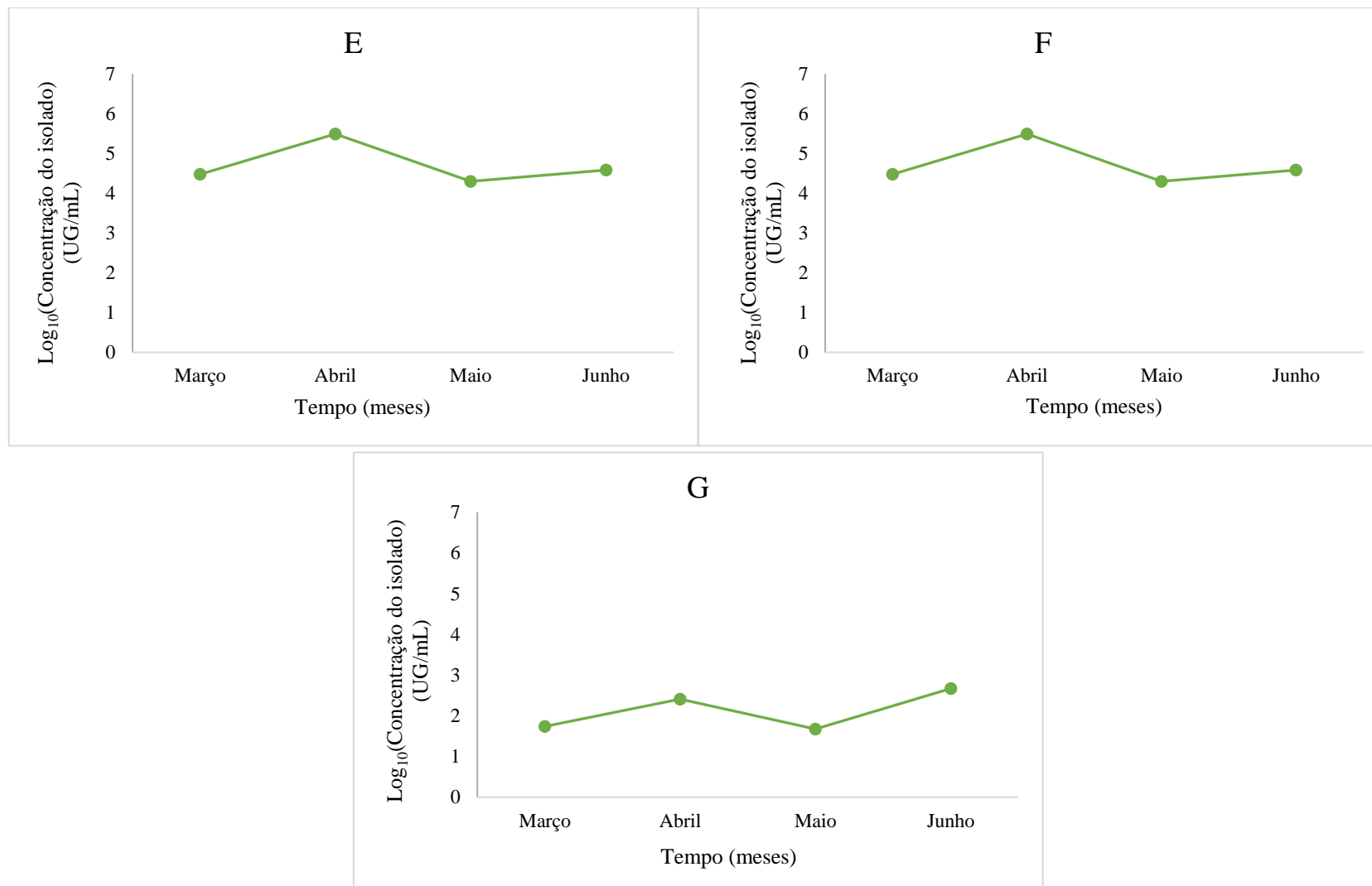


Figura 4.23 - Monitorização da concentração total de células (UG/mL) dos isolados: A - NPS 017; B – M.F. 22723; C – DSMZ 44848; D – SMG; E- 207B; F – NPS 203; G - NPS 129 ao longo de 4 meses, em condições de privação de nutrientes (crescimento em água destilada).

Através da monitorização da concentração de micobactérias ao longo dos quatro meses de privação de nutrientes (crescidas apenas em água destilada) é possível concluir que a concentração de células (UG/mL) se mantém, aproximadamente, constante ao longo do tempo. Isto indica que estas MNT têm a capacidade de sobreviver por longos períodos de tempo em ambientes com poucos ou nenhuns nutrientes, o que permite concluir que estas estirpes são bem-sucedidas nos sistemas de distribuição de água, dado que como referido anteriormente, neste sistemas a concentração de nutrientes é reduzida (Hunt *et al.*, 2004; Vaerewijck *et al.*, 2005).

4.5. Migração através de diferentes tipos de solos

Este ensaio visa perceber a forma como estas bactérias são permeadas através das diferentes camadas do solo e como podem eventualmente contaminar os lençóis freáticos. Para isto, analisou-se a permeabilidade da estirpe SMG ao longo de uma coluna de areia e outra de pedras (**Figura 4.24 e 4.25**).

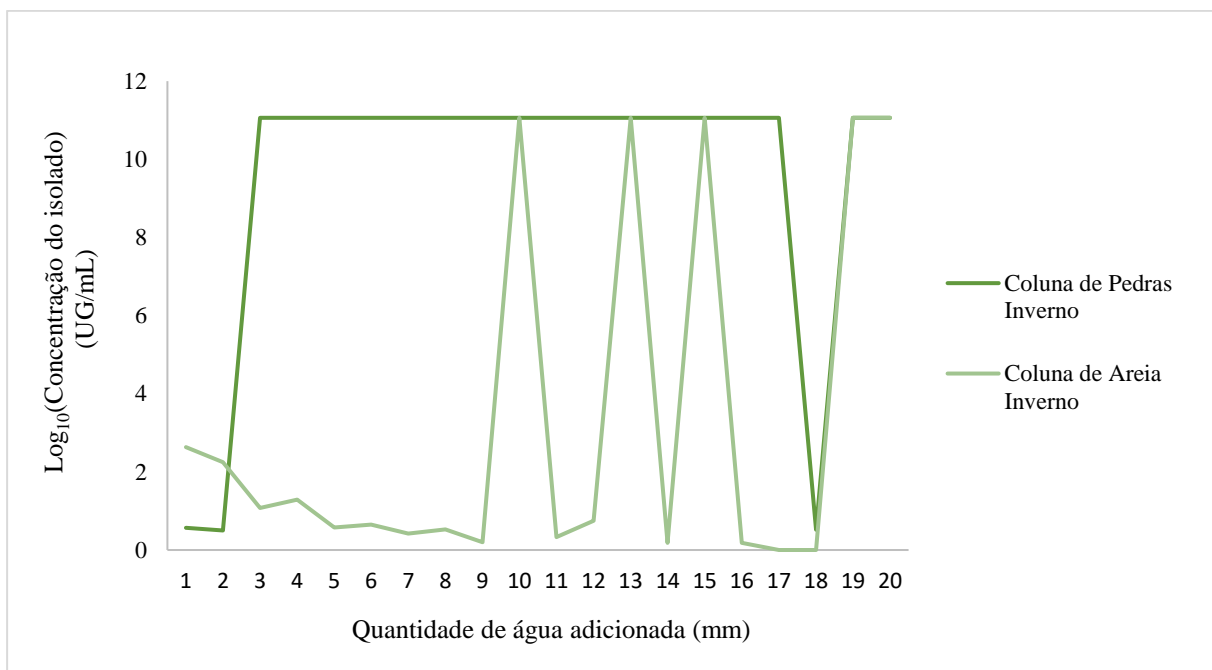


Figura 4.24 - Monitorização da concentração de SMG (UG/mL) recolhida no fim de uma coluna de pedras e de uma coluna de areia, a cada mm de água adicionada, aquando da adição de 20 mm de água.

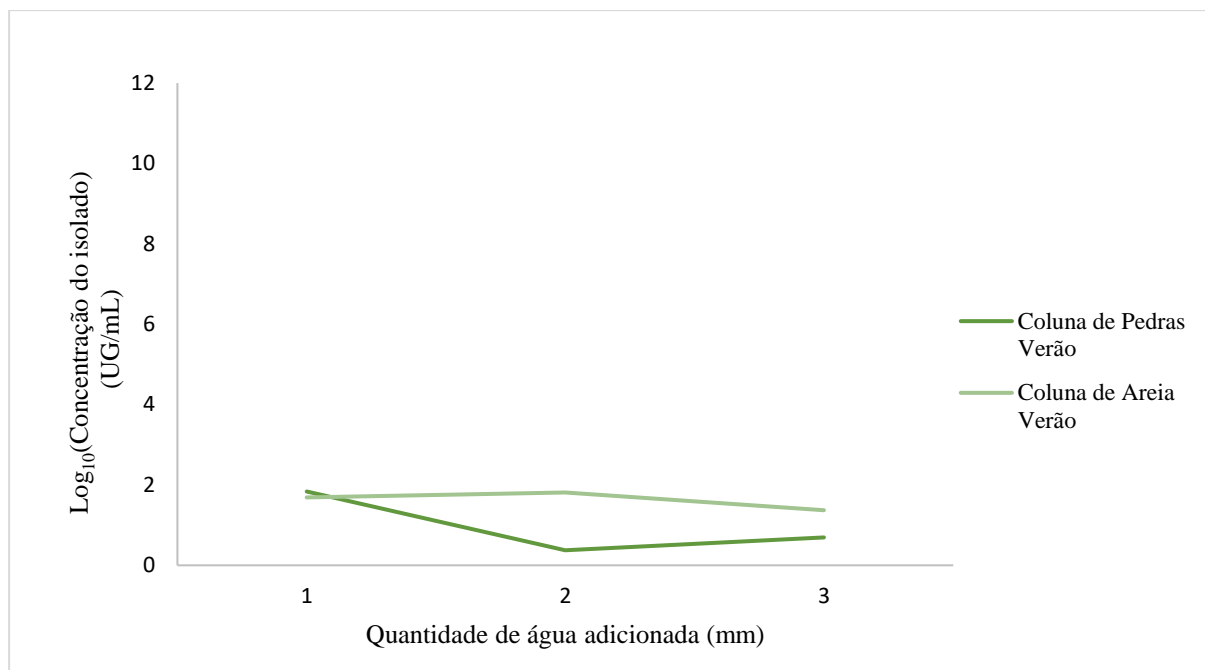


Figura 4.25 - Monitorização da concentração de SMG (UG/mL) recolhida no fim de uma coluna de pedras e de uma coluna de areia, a cada mm de água adicionada, aquando da adição de 3 mm de água.

Através da **Figura 4.24** e **Figura 4.25** é possível concluir que a permeabilização na coluna de pedras foi mais facilitada do que na coluna de areia, o que era esperado dado que a areia é um filtro natural, retardando assim o movimento das bactérias em comparação com as pedras.

Diferentes estudos têm vindo a detetar bactérias patogénicas e vírus em águas subterrâneas. Dentro destas bactérias e vírus, destacam-se a *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Escherichia coli* e *Vibrio* sp., vírus da hepatite, vírus *Norwalk*, *Echovirus* e poliovírus (Gerba & Keswick, 1981; Corapeioglu and Haridas, 1985).

A percolação de microrganismos através de diferentes camadas do solo aumenta a probabilidade de contaminação das águas subterrâneas. Se os microrganismos tiverem capacidade de sobreviver durante longos períodos de tempo, esta probabilidade de contaminação ainda é maior. As bactérias e os vírus conseguem atravessar meios porosos sendo a distância percorrida dependente do tipo dos poros do meio (Gerba, Wallis & Melnick, 1975). Têm sido realizados muitos estudos em campo e os resultados geralmente mostram um rápido movimento e elevada concentração de bactérias nas águas que recebem (Smith *et al.*, 1985). Isto pode ser explicado pelo fluxo preferencial dos microrganismos através dos macroporos, fissuras, fraturas, buracos de minhocas e canais formados pelas raízes das plantas, ou animais no solo (Abu-ashour *et al.*, 1994).

É de salientar que este é um trabalho introdutório para outro tipo de estudo, sendo necessário estudar a permeação ao longo de outros tipos de solo e com outras espécies de micobactérias para ser possível retirar conclusões.

5. Discussão

Ao longo das últimas décadas há uma crescente preocupação e necessidade em garantir a elevada qualidade das águas de consumo (Tzoupanos & Zouboulis, 2008). As fontes de água de consumo são sujeitas a diversas contaminações, devido, nomeadamente, à erosão dos solos, à degradação da vegetação e às descargas de lixo industrial e doméstico.

As MNT estão distribuídas em diferentes ambientes, nomeadamente nos sistemas de distribuição de água, sendo as redes de distribuição de água municipais atualmente reconhecidas como um dos maiores reservatórios de MNT (Wallace, Brown and Griffith, 1998).

Este projeto focou-se na resistência e sobrevivência desses microrganismos quando confrontados com condições ambientais adversas, particularmente algumas das condições a que são sujeitos durante os processos de desinfecção nos sistemas de distribuição de água. Através deste estudo, foi possível observar que a origem dos isolados de MNT em estudo dita, em parte, a resposta que estas têm quando expostos a diferentes tipos de stress, podendo-lhes conferir assim vantagens adaptativas.

Em primeiro lugar, nos ensaios de temperatura e de pH, observou-se que a amplitude de resistência observada pelos isolados *Mycobacterium* estudados, é extremamente notável quando comparado com outras espécies microbianas, mesmo alguns extremófilos como *Sulfolobus yangmingensis*, que cresce entre valores de temperatura de 65-95 °C e pH 2.0-6.0 (Jan *et al.*, 1999), *Anaerobranca gottschalkii*, que cresce entre valores de temperatura de 30-65 °C e pH 6.0-10.5 (Prowe & Antranikian, 2001) e *Thermococcus thio-reducens*, que cresce entre valores de temperatura de 55-94 °C e pH 5.0-8.5 (Pikuta *et al.*, 2007).

Nos ensaios de exposição ao cloro, concluiu-se que a sensibilidade/resistência ao cloro depende da ausência/presença de cloro no *habitat* natural dos isolados, isto é, isolados de ambientes com cloro apresentam uma gama de resistência ao cloro elevada ao contrário de isolados de ambientes sem ou com poucas quantidades de cloro, conferindo-lhes assim uma vantagem adaptativa.

Posteriormente, estudou-se as respostas de algumas MNT em estudo quando em condições de privação de nutrientes (água destilada), ao longo de 4 meses, observando-se que as células entram num estado latente caracterizado pela não existência de alterações morfológicas significativas (tamanho e forma das células), diminuição em 5 vezes da concentração total de ATP (p/mL), concluindo-se assim que o ATP funciona também como um regulador global do crescimento e/ou manutenção da viabilidade das bactérias em estado de não crescimento através do controlo da sua atividade metabólica global (Falkinham III, Norton and Mark, 2001) e pela manutenção da concentração de células (UG/mL). Isto indica que as MNT em estudo têm a capacidade de sobreviver por longos períodos de tempo em ambientes com reduzida quantidade de nutrientes.

Por fim, estudou-se a permeação de diferentes camadas do solo (areia e pedras) à estirpe SMG, permitindo concluir que a permeabilização na coluna de pedras foi mais facilitada do que na coluna de areia, dado que este último é considerado um filtro natural, retardando assim o movimento das (mico)bactérias em comparação às pedras. Este foi um estudo introdutório sendo necessário testar outros tipos de solos bem como o comportamento de outras espécies de micobactérias para ser possível tirar conclusões sobre a permeabilidade destas bactérias ao longo de diferentes tipos de solo.

Desta forma, foi possível observar que micobactérias são muito tolerantes a diferentes tipos de stress físicos e químicos, o que pode explicar a sua permanência nos sistemas de distribuição de água. De forma a ter uma compreensão total destes mecanismos são necessários outros estudos, nomeadamente metagenómicos e proteómicos. Adicionalmente, é importante estudar também a resistência das

micobactérias a outros tipos de stress, nomeadamente a privação de oxigénio, solventes orgânicos, metais pesados, a produção de biofilmes, entre outros, dado que são outros fatores relacionados com os processos de desinfecção nos sistemas de tratamento de águas.

6. Conclusão

Através deste estudo foi possível observar que as MNT têm uma elevada capacidade de resistência a diferentes tipos de *stress*, nomeadamente temperatura, pH, cloro e privação de nutrientes, observando-se que os isolados do género *Mycobacterium* testados foram capazes de se adaptar a estes múltiplos *stress*. Isto indica que estes isolados apresentam estratégias de adaptação a alterações ambientais notáveis e que têm elevados limites de crescimento quando comparados com outros microrganismos (nomeadamente extremófilos).

Esta tolerância observada permite justificar, em parte, a manutenção das MNT nos sistemas de distribuição de água. Contudo, são ainda necessários estudos complementares para perceber quais os mecanismos envolvidos na resistência das micobactérias aos diferentes tipos de *stress*.

Isto indica que o estudo da resistência das micobactérias (não-tuberculosas) a diferente *stress* nas águas dos sistemas de distribuição é crucial para melhorar a eficácia dos processos de desinfecção utilizados nestes sistemas e consequentemente garantir a qualidade das águas de consumo.

7. Referências bibliográficas

- Abu-ashour, J., Joy, D. M., Lee, H., Whiteley, H. R. & Zelin, S. (1994) Transport of microorganisms through soil. *Water, air and soil pollution*, 75, pp. 141–158.
- Alderwick, L. J., Harrison, J., Lloyd, G. S. & Birch, H. L. (2015) The Mycobacterial Cell Wall - Peptidoglycan and Arabinogalactan. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5, pp. 1–15.
- Allison, D. G. (2003) The Biofilm Matrix. *Biofouling*, 19(2), pp. 139–150.
- Archuleta, R., Mullens, P. & Primm, T. P. (2002) The relationship of temperature to desiccation and starvation tolerance of the *Mycobacterium avium* complex. *Archives of Microbiology*, 178, pp. 311–314.
- Bailey, R. K., Wyles, S., Dingley, M., Hesse, F. & Kent, G. W. (1970) The isolation of high catalase *Mycobacterium kansasii* from tap water. *The American review of respiratory disease*, 101(3), pp.430–1.
- Baker, R. M., Singleton, F. L. & Hood, M. A. (1983) Effects of Nutrient Deprivation on *Vibrio cholerae*. *Applied and environmental microbiology*, 46(4), pp. 930–940.
- Barbeau, J., Gauthier, C. & Payment, P. (1998) Biofilms, infectious agents, and dental unit waterlines: a review. *Canadian journal of microbiology*, 44, pp. 1019–28.
- Bardouniotis, E., Ceri, H. & Olson, M. E. (2003) Biofilm formation and biocide susceptibility testing of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium marinum*. *Current Microbiology*, 46, pp. 28–32.
- Bardouniotis, E., Huddleston, W., Ceri, H. & Olson, M. E. (2001) Characterization of biofilm growth and biocide susceptibility testing of *Mycobacterium phlei* using the MBEC assay systems. *FEMS Microbiology Letters*, 203, pp. 263–267.
- Batté, M., Appenzeller, B. M. R., Grandjean, D., Fass, S., Gauthier, V., Jorand, F., Mathieu, L., Boualam, M., Saby, S. & Block, J. C. (2003) Biofilms in Drinking Water Distribution Systems. *Reviews in Environmental Science and BioTechnology*, 2(2–4), pp. 147–168.
- Batté, M., Appenzeller, B. M. R., Grandjean, D., Fass, S., Gauthier, V., Jorand, F., Mathieu, L., Boualam, M., Saby, S. & Block, J. C. (2004) Biofilms in drinking water distribution systems. *Reviews in Environmental Science and BioTechnology*, 2, pp. 147–168.
- Benarde, M. A., Snow, W. B. & Olivieri, V. P. (1967) Kinetics and Mechanism of Bacterial Disinfection by Chlorine Dioxide. *Applied Microbiology*, 15(2), pp. 257–265.
- Bercovier, H. & Vincent, V. (2001) Mycobacterial infections in domestic and wild animals due to *Mycobacterium marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. porcinum*, *M. farcinogenes*, *M. smegmatis*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. kansasii*, *M. simiae* and *M. genavense*. *Rev Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 20(1), pp. 265–290.
- Bergey, D. H. (1919) Thermophilic Bacteria. *Journal of Bacteriology*, IV(4), pp. 301–306.
- Boe-Hansen, R. (2001) Microbial growth in drinking water distribution systems. Technical University of Denmark.
- Booth, I. R. (1985) Regulation of Cytoplasmic pH in Bacteria. *Microbiological reviews*, 49(4), pp. 359–378.

- Booth, I.R. (1985) Regulation of Cytoplasmic pH in Bacteria. *Microbiological reviews*, 49(4), pp. 359–378.
- Brem, W. (1909) Investigation of blood for Tubercle Bacilli. *Journal of the American Medical Association*, LIII(12), pp. 909–911.
- Brennan, P. J. & Nikaido, H. (1995) The Envelope of Mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 64, pp. 29–63.
- Brennan, P. J. (2003) Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 83, pp. 91–97.
- Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R. & Casadevall, A. (2015) Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 13(10), pp. 620–630.
- Brown, M. R. W., Collier, P. J. & Gilbert, P. (1990) Influence of Growth Rate on Susceptibility to Antimicrobial Agents: Modification of the Cell Envelope and Batch and Continuous Culture Studies. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 34(9), pp. 1623–1628.
- Bullin, C. H., Tanner, E. I. & Collins, C. H. (1970) Isolation of *Mycobacterium xenopi* from water taps. *Journal of Hygiene*, 68, pp. 97–100.
- Cambau, E. & Drancourt, M. (2014) Steps towards the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* by Robert Koch, 1882. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, pp. 196–201.
- Camper, A. K. & Mcfeters, G. A. (1979) Chlorine Injury and the Enumeration of Waterborne Coliform Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(3), pp. 633–641.
- Carson, L. A., Petersen, N. J., Favero, M. S. & Agüero, S. M. (1978) Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology*, 36(6), pp. 839–846.
- Castanie-Cornet, M.-P., Penfound, T. A., Smith, D., Elliott, J. F. & Foster, J. W. (1999) Control of Acid Resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181(11), pp. 3525–3535.
- Characklis, W. G. & Marshall, K. C. (1990) Biofilm processes. *Biofilms*, pp. 195–231.
- Collins, C. H., Grange, J. M. & Yates, M. D. (1984) Mycobacteria in water. *Journal of Applied Bacteriology*, 57, pp. 193–211.
- Corapeioglu, M. Y. & Haridas, A. (1985) Microbial transport in soils and groundwater: A numerical model. *Adv Water Resources*, 8, pp. 188–200.
- Covert, T. C., Rodgers, M. R., Reyes, A. L. & Stelma, G. N. (1999) Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), pp. 2492–2496.
- Daffé, M. & Draper, P. (1997) The Envelope Layers of Mycobacteria with Reference to their Pathogenicity. *Advances in Microbial Physiology*.
- Davey, M. E. & O'toole, G. A. (2000) Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), pp. 847–867.

- Dennis, W. H., Oliviert, V. P. & Krusé, C. W. (1979) Mechanism of disinfection: incorporation of ci-36 into f2 virus. *Water Research*, 13, pp. 363–369.
- Dhakar, K. & Pandey, A. (2016) Wide pH range tolerance in extremophiles: towards understanding an important phenomenon for future biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(6), pp. 2499–510.
- Dizon, D., Mihailescu, C. & Bae, H. C. (1976) Simple Procedure for Detection of *Mycobacterium gordonae* in Water Causing False-Positive Acid-Fast Smears. *Journal of Clinical Microbiology*, 3(2), p. 1976.
- Dmitriev, B. A., Ehlers, S., Rietschel, E. T. & Brennan, P. J. (2000) Molecular mechanics of the mycobacterial cell wall: From horizontal layers to vertical scaffolds. *International Journal of Medical Microbiology*. Urban & Fischer Verlag, 290, pp. 251–258.
- du Moulin, G. C., Stottmeier, K. D., Pelletier, P. A., Tsang, A. Y. & Hedley-Whyte, J. (1988) Concentration of *Mycobacterium avium* by hospital hot water systems. *Jama*, 260(11), pp. 1599–1601.
- EPA (1992) Control of biofilm growth in drinking water distribution systems, pp. 1–55.
- Falkinham III, J. O. (1996) Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(2), pp. 177–215.
- Falkinham III, J. O. (2002) Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clinics in Chest Medicine*, 23, pp. 529–551.
- Falkinham III, J. O. (2003) The changing pattern of nontuberculous mycobacterial disease. *The Canadian journal of infectious diseases*, 14(5), pp. 281–6.
- Falkinham III, J. O. (2009) Surrounded by mycobacteria: Nontuberculous mycobacteria in the human environment. *Journal of Applied Microbiology*, 107, pp. 356–367.
- Falkinham III, J. O., Norton, C. D. & LeChevallier, M. W. (2001) Factors Influencing Numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and Other Mycobacteria in Drinking Water Distribution Systems. *Applied and environmental microbiology*, 67(3), pp. 1225–1231.
- Falkinham III, J. O., Norton, C. D. & Mark, W. (2001) Factors Influencing Numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and Other Mycobacteria in Drinking Water Distribution Systems. *Applied and environmental microbiology*, 67(3), pp. 1225–1231.
- Farrell, J. & Rose, A. (1967) Temperature effects on microorganisms. *Annual Review of Microbiology*, 21, pp. 101–120.
- Fiala, G., Stetter, K. O., Jannaschi, H. W., Langworthy, T. A. & Madon, J. (1986) *Staphylothermus marinus* sp. nov. Represents a Novel Genus of Extremely Thermophilic Submarine Heterotrophic Archaeobacteria Growing up to 98 °C. *Systematic and applied microbiology*, 8, pp. 106–113.
- Foster, J. W. & Spector, M. P. (1995) How salmonella survive against the odds. *Annual Review of Microbiology*, 49, pp. 145–174.
- Freese, E., Sheu, C. W. & Galliers, E. (1973) Function of Lipophilic Acids as antimicrobial food additives. *Nature*, 241, pp. 321–325.

- Gengenbacher, M., Rao, S. P. S., Pethe, K. & Dick, T. (2010) Nutrient-starved, non-replicating *Mycobacterium tuberculosis* requires respiration, ATP synthase and isocitrate lyase for maintenance of ATP homeostasis and viability. *Microbiology*, 156, pp. 81–87.
- Gentry, C. A. (1996) Atypical mycobacteria. *Pharmacotherapy Self-Assessment Program*.
- Gerba, C. P. & Keswick, B. H. (1980) Viruses in groundwater. *Environmental Science and Technology*, 14(11), pp. 1290–1297.
- Gerba, C. P. & Keswick, B. H. (1981) Survival and transport of enteric viruses and bacteria in groundwater. In *Quality of groundwater*, pp. 511–515.
- Gerba, C. P., Wallis, C. & Melnick, J. L. (1975) Fate of wastewater bacteria and viruses in soil. *Journal of the irrigation and drainage division*, pp. 158–172.
- Graham, A. F. & Lund, B. M. (1983) The Effect of Alkaline pH on Growth and Metabolic Products of a Motile, yellow-pigmented *Streptococcus* sp.. *Journal of general Microbiology*, 129, pp. 2429–2435.
- Hamm, L. L., Nakhoul, N. & Hering-smith, K. S. (2015) Acid-Base Homeostasis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10, pp. 1–11.
- Hansen, G. A. (1875) On the Etiology of Leprosy. *British and foreign medico-chirurgical Review*, 55(110), pp. 459–489.
- Havlir, D., Kemper, C. A. & Deresinski, S. C. (1993) Reproducibility of lysis-centrifugation cultures for quantification of *Mycobacterium avium* complex bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(7), pp. 1794–1798.
- Heinen, W. (1971) Growth Conditions and Temperature-Dependent Substrate Specificity of Two Extremely Thermophilic Bacteria. *Archives of Microbiology*, 76, pp. 2–17.
- Hett, E. C. & Rubin, E. J. (2008) Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(1), pp. 126–156.
- Hickey, H. E. (2008) *Water Supply Systems and Evaluation Methods*, U.S. Fire Administration.
- Huang, Y. & Ito, J. (1998) The hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* has two different classes of family C DNA polymerases: evolutionary implications. *Nucleic Acids Research*, 26(23), pp. 5300–5309.
- Huber, R., Wilharm, T., Huber, Dagmar, Trincone, A., Burggraf, S., König, H., Rachel, R., Rockinger, I., Fricke, H. & Stetter, K. O. (1992) *Aquifex pyrophilus* gen . nov . sp . nov ., Represents a Novel Group of Marine Hyperthermophilic Hydrogen-Oxidizing Bacteria. *System Appl Microbiology*, 15, pp. 340–351.
- Hunt, S. M., Werner, E. M., Huang, B., Hamilton, M. A. & Stewart, P. S. (2004) Hypothesis for the Role of Nutrient Starvation in Biofilm Detachment. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), pp. 7418–7425.
- Inderlied, C. B., Young, L. S. & Yamada, J. K. (1987) Determination of *in vitro* susceptibility of *Mycobacterium avium* complex isolates to antimycobacterial agents by various methods. *Antimicrobial Agents Chemother*, 31(11), pp. 1697–1702.

Instituto Português do Mar e Atmosfera (2017) Monitorização da Seca - Índice PDSI – Evolução. Disponível em: <https://www.ipma.pt/pt/oclima/observatorio.secas/pdsi/monitorizacao/evolucao/>. [Acedido a 1 de Maio de 2018].

Integrated Taxonomic Information System on-line database (2017). Integrated Taxonomic Information System on-line database – ITIS. Disponível em: <https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt> [Acedido a 10 de Janeiro de 2018].

Jan, R.-L., Wu, J., Chaw, S.-M., Tsai, C.-W. & Tsen, S. (1999) A novel species of thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus yangmingensis* sp.nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, pp. 1809–1816.

Kazda, J., Pavlik, I., Falkinham III, J. O. & Hruska, K. (2009) The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health. *Springer Netherlands*.

Kennedy, T. P. & Weber, D. J. (1994) Nontuberculous mycobacteria: An underappreciated cause of geriatric lung disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 149, pp. 1654–1658.

Kenneth, J. R. & Ray, C. G. (2004) Spread and control infection. *Sherrie Medical Microbiology - An Introduction to infectious diseases*, pp. 173–258.

Keswick, B., Wang, D.-S. & Gerba, C. (1982) The use of microorganisms as ground-water tracers: A review. *Ground water*, 20(2), pp. 142–149.

Kjelleberg, S., Albertson, N., Flärdh, K., Holmquist, L., Jouper-Jaan, A., Marouga, R., Ostling, J., Svenblad, B. & Weichart, D. (1993) How do non-differentiating bacteria adapt to starvation?. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 63(3–4), pp. 333–41.

Knox, W. E., Stumpf, P. K., Green, D. E. & Auerbach, V. H. (1948) The inhibition of sulfhydryl enzymes as the basis of the bactericidal action of chlorine. *Journal of Bacteriology*, 55(4), pp. 451–458.

Kolter, R., Siegele, D. A. & Tormo, A. (1993) The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annual Review of Microbiology*, 47, pp. 855–874.

Kotyk, A. (1961) Uptake of 2,4 - Dinitrophenol by the Yeast Cell. *Folia Microbiologica*, 7(2), pp. 109–114.

Krebs, H. A., Wiggins, D. & Stubbs, M. (1983) Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochemistry journal*, 214, pp. 657–663.

Kubica, G.P., Beam, R.E. & Palmer, J.W. (1963) A Method For The Isolation Of Unclassified Acid-Fast Bacilli From Soil And Water. *The American review of respiratory disease*, 88, pp.718–20.

Kuchta, J. M., States, S. J., McGlaughlin, J. E., Overmeyer, J. H., Wadowsky, R. M., McNamara, A. M., Wolford, R. S. & Yee, R. B. (1985) Enhanced Chlorine Resistance of Tap Water-Adapted *Legionella pneumophila* as Compared with Agar Medium-Passaged Strains. *Applied and environmental microbiology*, 50(1), pp. 21–26.

Lange, R. & Hengge-Aronis, R. (1991) Growth Phase-Regulated Expression of *bolA* and Morphology of Stationary-Phase *Escherichia coli* Cells Are Controlled by the Novel Sigma Factor sigma-s. *Journal of Bacteriology*, 173(14), pp. 4474–4481.

- Le Dantec, C., Duguet, J., Montiel, A., Dumoutier, N., Dubrou, S. & Vincet, V. (2002) Chlorine Disinfection of Atypical Mycobacteria Isolated from a Water Distribution System. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3), pp. 1025–1032.
- Lechevallier, M. W. (1999) Biofilms in Drinking water distribution systems: Significance and control in *Identifying Future Drinking Water Contaminants*, pp. 206–219.
- Lewis, K. (2001) Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(4), pp. 999–1007.
- Llorens, J. M. N., Tormo, A. & Martínez-Garcia, E. (2010) Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, pp. 476–495.
- Ludovici, P. P., Phillips R. A., & W. SJeter W. S. (1977) Comparative inactivation of bacteria and viruses in tertiary-treated wastewater by chlorination. *Disinfection: water and wastewater*, p. 359–390.
- Lund, P., Tramonti, A. & Biase, D. (2014) Coping with low pH: molecular strategies in neutralophilic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, pp. 1–35.
- Ma, Z., Richard, H., Tucker, D. L., Conway, T. & Foster, J. W. (2002) Collaborative Regulation of *Escherichia coli* Glutamate-Dependent Acid Resistance by Two AraC-Like Regulators, GadX and GadW (YhiW). *Journal of Bacteriology*, 184(24), pp. 7001–7012.
- Macris, B. J. (1975) Mechanism of Benzoic Acid Uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology*, 30(4), pp. 503–506.
- Maniar, A.C. & Vanbuckenhout, L.R. (1976) *Mycobacterium kansasii* from an environmental source. *Canadian journal of public health*, 67(1), pp.59–60.
- Margarella, A. M., Perrine, K. A., Lewis, T., Faubel, M., Winter, B. & Hemminger, J. C. (2013) Dissociation of Sulfuric Acid in aqueous solution: Determination of the photoelectron spectral fingerprints of H₂SO₄, HSO₄⁻, and SO₄²⁻ in water. *The journal of physical chemistry*, 17, pp. 8131–8137.
- Martínez, A., Torello, S. & Kolter, R. (1999) Sliding motility in mycobacteria. *Journal of Bacteriology*, 181(23), pp. 7331–7338.
- McSwiggan, D. A. & Collins, C. H. (1974) The isolation of *M. kansasii* and *M. xenopi* from water systems. *Tubercle*, 55, pp. 291–297.
- Nedwell, D. B. (1999) Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *FEMS Microbiology Ecology*, 30, pp. 101–111.
- Nishiuchi, Y., Iwamoto, T. & Maruyama, F. (2017) Infection Sources of a Common Non-tuberculous Mycobacterial Pathogen, *Mycobacterium avium* Complex. *Frontiers in Medicine*, 4. doi: 10.3389/fmed.2017.00027.
- Nyka, W. (1974) Studies on the effect of starvation on mycobacteria. *Infection and Immunity Immun*, 9(5), pp. 843–850.
- Nyström, T., Albertson, N. H., Flärdh, K. & Kjelleberg, S. (1990) Physiological and molecular adaptation to starvation and recovery from starvation by the marine *Vibrio* sp . S14, *Fems microbiology ecology*, 74, pp. 129–140.

- Nyström, T., Albertson, N. H., Flärdh, K. & Kjelleberg, S. (1990) Physiological and molecular adaptation to starvation and recovery from starvation by the marine *Vibrio* sp. S14. *FEMS Microbiology Ecology*, 74, pp. 129–140.
- Onyango, L. A. & Alreshidi, M. (2018) Adaptive Metabolism in Staphylococci: Survival and Persistence in Environmental and Clinical Settings. *Journal of Pathogens*, pp. 1–11.
- Osburn, M. R. & Amend, J. P. (2011) *Thermogladius shockii* gen. nov., sp. nov., a hyperthermophilic crenarchaeote from Yellowstone National Park, USA. *Archives of Microbiology*, 193, pp. 45–52.
- Padan, E., Zilberstein, D. & Rottenberg, H. (1976) The Proton Electrochemical Gradient in *Escherichia coli* Cells. *Journal biochemistry*, 541, pp. 533–541.
- Pandey, A. & Palni, L. M. S. (1997) *Bacillus* species: The dominant bacteria of the rhizosphere of established tea bushes', *Microbiological research*, 152, pp. 359–365.
- Pandey, R., Vischer, N. O. E., Smelt, J. P. P. M., Beilen, J. W. A. V., Beek, T. A., De Vos, H. W. (2016) Intracellular pH Response to Weak Acid Stress in Individual Vegetative *Bacillus subtilis* Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(21), pp. 6463–6471.
- Paull, A. (1973) An environmental study of the opportunist mycobacteria. *Medical laboratory technology*, 30(1), pp. 11–9.
- Pereira, W. E., Hoyano, Y., Summons, R. E., Bacon, V. A. & Duffield A. M. (1973) Chlorination Studies- The reaction of aqueous hypochlorous acid with alpha-aminoacids and dipeptides. *Biochimica et biophysica Acta*, 313, pp. 170–180.
- Piersimoni, C. & Scarparo, C. (2009) Extrapulmonary infections associated with nontuberculous mycobacteria in immunocompetent persons. *Emerging Infectious Diseases*, 15(9), pp. 1351–1358.
- Pikuta, E. V., Marsic, D., Itoh, T., Bej, A. K., Tang, J., Whitman, W. B., Ng, J. D. & Garriott, O. K. (2007) *Thermococcus thioerducens* sp. nov., a novel hyperthermophilic, obligately sulfur-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, pp. 1612–1618.
- Plorde, J. J. (2004) Mycobacteria. *Sherris Medical Microbiology - An Introduction to infectious diseases*, pp. 439–457.
- Portaels, F. (1995) Epidemiology of mycobacterial diseases. *Clinics in Dermatology*, 13, pp. 207–222.
- Prowe, S. G. & Antranikian, G. (2001) *Anaerobranca gottschalkii* sp. nov., a novel thermoalkaliphilic bacterium that grows anaerobically at high pH and temperature. *International Journal of Systematic*, 51, pp. 457–465.
- Pyle, B. H., Watters, S. K. & Mcfeters, G. A. (1994) Physiological aspects of disinfection resistance in *Pseudomonas cepacia*. *Journal of Applied Bacteriology*, 76, pp. 142–148.
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P. & El Jaziri, M. (2015) The formation of biofilms by *pseudomonas aeruginosa*: A review of the natural and synthetic compounds interfering with control Mechanisms. *BioMed Research International*, 2015, pp. 1–17.
- Rastogi, N., Legrand, E. & Sola, C. (2001) The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 20(1), pp. 21–54.
- Ratnayaka, D. D., Brandt, M. J. & Johnson, K. M. (2009) *Water Supply*.

- Recht, J. & Kolter, R. (2001) Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology*, 183(19), pp. 5718–5724.
- Recht, J., Martínez, A., Torello, S. & Kolter, R. (2000) Genetic Analysis of Sliding Motility in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology*, 182(15), pp. 4348–4351.
- Reich, J. M. & Johnson, R. E. (1991) *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease. Incidence, presentation, and response to therapy in a community setting. *The American review of respiratory disease*, 143(6), pp.1381–5.
- Ridgway, H. F. & Olson, B. H. (1982) Chlorine Resistance Patterns of Bacteria from Two Drinking Water Distribution Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(4), pp. 972–987.
- Roth, A., Fischer, M., Hamid, M. E., Michalke, S., Ludwing, W. & Mauch, H. (1998) Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(1), pp.139–147.
- Runyon, E. H. (1959) Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *The Medical clinics of North America*, 43(1), pp. 273–290.
- Safe Drinking Water Committee, Board on Toxicology and Environmental Health Hazards, Assembly of Life Sciences, Council & National Research Council (1982) *Drinking Water and Health*, 4.
- Sako, Y., Nomura, N., Uchida, A., Ishida, U., Morii, H., Koga, Y., Hoaki, T. & Maruyama, T. (1996) *Aeropyrum pernix* gen. nov., sp. nov., a Novel Aerobic Hyperthermophilic Archaeon Growing at Temperatures up to 100 °C. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(4), pp. 1070–1077.
- Santos, R. (2016) Diversity, stress responses and ecological behaviour of *Mycobacterium* species (Tese de Doutoramento). School of Biological Sciences Faculty of Medicine, Health and Life Sciences - Queens University Belfast, Belfast.
- Santos, R., Carvalho, C. C., Stevenson, A., Grant, I. R. & Hallsworth, J. E. (2015) Extraordinary solute-stress tolerance contributes to the environmental tenacity of mycobacteria. *Environmental Microbiology Reports*, 7(5), pp. 746–764.
- Sarathy, J., Dartois, V., Dick, T. & Gengenbacher, M. (2013) Reduced Drug Uptake in Phenotypically Resistant Nutrient-Starved Nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(4), pp. 1648–1653.
- Saviola, B. (2010) All Stressed Out: Mycobacterial Responses to Stress. *Applied Microbiology*, pp. 545–549.
- Saviola, B. (2012) ‘Response of Mycobacterial Species to an acidic environment’, in *Understanding Tuberculosis- Deciphering the secret life of the bacilli*, pp. 89–102.
- Schulze-Röbbecke, R. & Buchholtz, K. (1992) Heat susceptibility of aquatic mycobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(6), pp. 1869–1873.
- Schulze-Röbbecke, R., Janning, B. & Fischeder, R. (1992) Occurrence of mycobacteria in biofilm samples. *Tubercle and Lung Disease*, 73, pp. 141–144.
- Schwartz, T., Kalmbach, S., Hoffmann, S., Szewzyk, U. & Obst, U. (1998) PCR-based detection of mycobacteria in biofilms from a drinking water distribution systems. *Journal of Microbiological Methods*, 34(2), pp. 113–123.

- Shih, K. L. & Lederberg, J. (1976) Chloramine Mutagenesis in *Bacillus subtilis*. *Science*, 192(4244), pp. 1141–3.
- Shih, K. L. & Lederberg, J. (1976) Effects of Chloramine on *Bacillus subtilis* Deoxyribonucleic Acid. *Journal of Bacteriology*, 125(3), pp. 934–945.
- Shrivastava, R., Upreti, R. K., Jain, S. R., Prasad, K. N., Seth, P. K. & Chaturvedi, U. C. (2004) Suboptimal chlorine treatment of drinking water leads to selection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58, pp. 277–283.
- Slonczewski, J. L., Rosen, B. P., Alger, J. R. & Macnab, R. M. (1981) pH homeostasis in *Escherichia coli*: Measurement by ³¹P nuclear magnetic resonance of methylphosphonate and phosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(10), pp. 6271–6275.
- Smeulders, M. J., Keer, J., Speight, R. A. & Williams, H. D. (1999) Adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to Stationary Phase. *Journal of Bacteriology*, 181(1), pp. 270–283.
- Smith, M. S., Thomas, G. W., White, R. E. & Ritonga, D. (1985) Transport of *Escherichia coli* Through Intact and Disturbed Soil Columns. *Journal of Environmental Quality*, 14(1), pp. 87–91.
- Stackebrandt, E., Rayney, F. A. & Ward-rainey, N. L. (1997) Proposal for a New Hierarchic Classification System, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2), pp. 479–491.
- Steadham, J. E. (1980) High-catalase strains of *Mycobacterium kansasii* isolated from water in Texas. *Journal of Clinical Microbiology*, 11(5), pp. 496–498.
- Stevenson, A., Cray, J. A., Williams, J. P., Santos, R., Sahay, R., Neuenkirchen, N., McClure, C. D., Grant, I. R., Houghton, J. D., Quinn, J. P., Timson, D. J., Patil, S. V., Singhal, R. S., Antón, J., Dijksterhuis, J., Hocking, A. D., Lievens, B., Rangel, D. E. N., Voytek, M. A., Gunde-Cimerman, N., Oren, A., Timmis, K. N., McGenity, T. J. & Hallsworth, J. E. (2015) Is there a common water-activity limit for the three domains of life?. *The ISME Journal*, 9(6), pp. 1333–1351.
- Stewart, G. R., Wemisch, L., Stabler, R., Mangan, J. A., Hids, J., Laing, K. G., Butcher, P. D. & Young, D. B. (2002) The heat shock response of *Mycobacterium tuberculosis*: Linking gene expression, immunology and pathogenesis. *Comparative and Functional Genomics*, 3, pp. 348–351.
- Stewart, M. I. C. H. & Olson, B. H. (1992) Physiological Studies of Chloramine Resistance Developed by *Klebsiella pneumoniae* under Low-Nutrient Growth Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(9), pp. 2918–2927.
- Stewart, P. S., Rayner, J., Roe, F. & Rees, W. M. (2001) Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. *Journal of Applied Microbiology*, 91, pp. 525–532.
- Stratford, M. & Rose, A. H. (1986) Transport of Sulphur Dioxide by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of general Microbiology*, 132, pp. 1–6.
- Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W. & Schleifer, K.-H. (2000) Microbiological Safety Of Drinking Water. *Annual Review of Microbiology*, (54), pp. 81–127.

- Taylor, R. H., Falkinham III, J. O. F. & Norton, C. D. (2000) Chlorine, Chloramine, Chlorine Dioxide, and Ozone Susceptibility of *Mycobacterium avium*. *Applied and environmental microbiology*, 66(4), pp. 1702–1705.
- Thien-fah, C. M. & O'Toole, G. A. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*, 9(1), pp. 34–39.
- Thomson, R. M., Carter, R., Tolson, C., Coulter, C., Huygens, F. & Hargreaves, M. (2013) Factors associated with the isolation of Nontuberculous mycobacteria (NTM) from a large municipal water system in Brisbane, Australia. *BMC Microbiology*, 13.
- Tortoli, E. (2003) Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: The new mycobacteria of the 1990s. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2), pp. 319–354.
- Torvinen, E., Lehtola, M. J., Martikainen, P. J. & Miettinen, I. T. (2007) Survival of *Mycobacterium avium* in drinking water biofilms as affected by water flow velocity, availability of phosphorus, and temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(19), pp. 6201–6207.
- Tsintzou, A., Vantarakis, A., Pagonopoulou, O., Athanassiadou, A. & Papapetropoulou, M (1999) Occurrence of Environmental mycobacteria in drinking water before and after replacement of the water distribution network. *Water, air and soil pollution*, 120, pp. 273–282.
- Tzoupanos, N. D. & Zouboulis, A. I. (2008) Coagulation-flocculation processes in water/ wastewater treatment: the application of new generation of chemical reagents. *International Conference on Heat Transfer, Thermal Engineering and Environment*, pp. 309–317.
- U.S. Climate Data (2017) U.S. Climate Data. Disponível em: <https://www.usclimatedata.com/climate/montana/united-states/919> [Acedido a 05 de Fevereiro de 2018].
- Vaerewijck, M. J. M., Huys, G., Palomino, J. C., Swings, J. & Portaels, F. (2005) Mycobacteria in drinking water distribution systems: Ecology and significance for human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, pp. 911–934.
- Van Ingen, J., Boeree, M. J., Soolingen, D. V. & Mouton, J. W. (2012) Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. *Drug Resistance Updates*, 15, pp. 149–161.
- Vandal, O. H., Nathan, C. F. & Ehrt, S. (2009) Acid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 191(15), pp. 4714–4721.
- Vilchèze, C. & Kremer, L. (2017) Acid-Fast Positive and Acid-Fast Negative *Mycobacterium tuberculosis*: The Koch Paradox. *Microbiology Spectrum*.
- Vivek, K., Thomas, W. & Musser, J. (1994) Is *Mycobacterium tuberculosis* 15,000 Years Old?
- Wai, S. N., Mizunoe, Y. & Yoshida, S.-i. (1999) How *Vibrio cholerae* survive during starvation. *FEMS Microbiology Letters*, 180, pp. 123–131.
- Wallace, R. J., Brown, B. A. & Griffith, D. E. (1998) Nosocomial Outbreaks/Pseudo- Outbreaks Caused By Nontuberculous Mycobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 52, pp. 453–90.
- Watnick, P. & Kolter, R. (2000) Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, 182(10), pp. 2675–2679.

- Watson, S. P., Clements, M. O. & Foster, S. J. (1998) Characterization of the Starvation-Survival Response of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 180(7), pp. 1750–1758.
- Wingender, J., Neu, T. & Flemming, H. (1999) *Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure, and function*.
- Wolinsky, E. (1979). Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *The American review of respiratory disease*, 119(1), pp.107–59.
- Woods, G. L., Bergmann, J. S., Witebsky, F. G., Fahle, G. A., Wanger, A., Boulet, B., Plaunt, M., Brown, B. A. & Wallace, R. J. (1999) Multisite Reproducibility of Results Obtained by the Broth Microdilution Method for Susceptibility Testing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, and *Mycobacterium fortuitum*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), pp. 1676–1682.
- Wu, M.- L., Gengenbacher, M. & Dick, T. (2016) Mild nutrient starvation triggers the development of a small-cell survival morphotype in mycobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Zakowski, P., Fligiel, S., Berlin, G. W. & Johnson, L. (1982) Disseminated *Mycobacterium avium-intracellulare* Infection in Homosexual Men Dying of Acquired Immunodeficiency. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 248(22), pp. 2980–2982.